

Untersuchungen zu den spezifischen Auswirkungen von HGF im
Vergleich zu KGF und GM-CSF auf primäre Keratinozyten in einem
Kokultur-Wundheilungsmodell

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität zu Köln

vorgelegt von

Stephanie Schnickmann

aus Köln

Köln, 2005

Berichtersteller:

Tag der mündlichen Prüfung

PD Dr. Sprenger
Prof. Dr. Dohmen
18. Juli 2005

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abkürzungsverzeichnis.....	IX
1 Einleitung.....	1
1.1 Die Haut	1
1.2 Die kutane Wundheilung.....	2
1.2.1 Die Bildung des Thrombus.....	3
1.2.2 Die Entzündungsphase.....	4
1.2.3 Die Proliferationsphase.....	5
1.2.4 Die Bildung des Narbengewebes.....	7
1.3 Der Wachstumsfaktor HGF und sein Rezeptor MET.....	7
1.3.1 Vorkommen und Struktur von HGF und MET.....	7
1.3.2 Induktion der HGF- und MET-Expression.....	8
1.3.3 Rezeptoraktivierung und Degradation des HGF/MET-Komplexes.....	9
1.3.4 Das HGF/MET-Signaltransduktionssystem.....	10
1.3.5 Funktionelle Aspekte der HGF/MET-Signaltransduktion in epithelialen Zellen.....	12
1.3.6 Molekulare Mechanismen der spezifischen Effekte des HGF/MET-Signaltransduktionssystems.....	12
1.3.7 Vorkommen und Expression von HGF und MET in der Haut.....	13
1.3.8 Molekulare und biologische Effekte des HGF/MET-Signaltransduktionssystems in der Haut	14
1.3.9 Das HGF/MET-Signaltransduktionssystem in der kutanen Wundheilung.....	15
1.3.10 Die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur als realitätsnahes Wundheilungsmodell zur Analyse zytokinspezifischer Effekte.....	17
2 Zielsetzung.....	19
3 Material und Methoden.....	20
3.1 Materialien und Chemikalien.....	20
3.2 Geräte.....	20
3.3 Antikörper.....	21
3.4 Oligomukleotide.....	21

3.5	Analysen der murinen, kutanen Wundheilung.....	23
3.5.1	Wundheilungsexperimente und Herstellung der Schnittpräparate.....	23
3.5.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus Wundgewebe.....	23
3.6	Zellkultur.....	24
3.6.1	Kultivierung der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur.....	24
3.6.1.1	Stimulierungsversuche zur Analyse morphologischer Effekte.....	24
3.6.1.2	Stimulierungsversuche zur Isolierung von Gesamt-RNA und zellulären Proteinextrakten aus primären Keratinozyten	25
3.6.2	Kultivierung der HaCaT Zell-Linie.....	25
3.6.2.1	Stimulierungsversuche zur Isolierung von Gesamt-RNA und zellulären Proteinextrakten aus HaCaT-Zellen.....	25
3.6.2.2	Migrationstest.....	26
3.7	Protein-Analytik.....	27
3.7.1	Isolierung zellulärer Gesamt-Proteinextrakte.....	27
3.7.2	Protein-Quantifizierung nach Bradford.....	28
3.7.3	Western Immunoblot.....	28
3.7.4	Immunhistochemie.....	30
3.8	Nukleinsäuren-Analytik.....	31
3.8.1	Isolierung von Gesamt-RNA.....	31
3.8.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese).....	31
3.8.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	32
3.8.4	Semiquantitative ‚realtime‘ PCR.....	32
3.8.5	‚GeneChip® Expression Arrays‘.....	34
3.8.5.1	Generierung der Arraydaten.....	34
3.8.5.2	Bioinformatische Auswertung	34
4	Ergebnisse.....	37
4.1	Die Expression von MET und HGF im Verlauf der kutanen Wundheilung....	37
4.1.1	Die MET-Expression in der kutanen Wundheilung.....	37
4.1.2	Die HGF-Expression in der kutanen Wundheilung.....	39
4.2	Etablierung der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur als Wundheilungsmodell.....	41

4.2.1	Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von HGF, KGF und GM-CSF in c-jun ^{-/-} Fibroblasten.....	42
4.2.2	Auswirkungen von HGF, KGF und GM-CSF auf primäre Keratinozyten in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur	43
4.2.3	Bestimmung des Zeitpunkts maßgeblicher Veränderungen der mRNA-Expression durch HGF, KGF und GM-CSF.....	46
4.3	‚GeneChip® Expression Array‘-Hybridisierung und bioinformatische Auswertung.....	50
4.3.1	‚GeneChip® Expression Array‘-Hybridisierung	50
4.3.2	Vergleichende Analyse der relativen mRNA-Expressionswerte auf Basis der ‚GeneChip® Expression Array‘-Daten.....	51
4.3.2.1	Identifikation der Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF.....	51
4.3.2.2	Auswertung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene.....	56
4.4	Validierung der Zielgenexpression durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR....	58
4.5	Analyse der Proteinexpression von uPAR und CTGF im Western Immunoblot.....	63
4.6	Einfluß von uPAR auf die zytokinabhängige Migration von Keratinozyten....	66
4.6.1	Nachweis der Expression von uPAR und seinem Liganden uPA in HaCaT Zellen.....	66
4.6.2	Auswirkung der Neutralisierung von uPAR auf die Migration von HaCaT Zellen.....	68
4.7	Expression von uPAR im Verlauf der kutanen Wundheilung.....	73
4.7.1	Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von uPAR.....	73
4.7.2	Lokalisation von uPAR im Verlauf der kutanen Wundheilung.....	74
5	Diskussion.....	79
5.1	MET- und HGF-Expression in der kutanen Wundheilung.....	79
5.2	Zytokinbedingte Effekte in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur.....	80
5.3	Zielgenanalysen.....	81
5.3.1	Validität der ermittelten mRNA-Expressionsunterschiede.....	81
5.3.2	Bestätigung der zytokinabhängigen Zielgenregulation.....	84
5.3.3	Funktionelle Aspekte der zytokinabhängigen Zielgenregulation.....	85
5.3.4	<i>In vivo</i> Bedeutung der HGF-vermittelten Induktion der uPAR-Expression.....	90
6	Zusammenfassung.....	92

7	Literatur.....	94
8	Anhang.....	114
8.1	Tabellen der Array-Auswertungen.....	114
8.2	Kurzzusammenfassung.....	142
8.3	Abstract.....	143
8.4	Danksagung.....	144
8.5	Erklärung gemäß der Promotionsordnung (§ 3 Abs. 1 Nr. 10).....	145
8.6	Lebenslauf.....	146

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Stadien der kutanen Wundheilung.....	4
Abbildung 2	Schematische Darstellung von HGF und MET.....	8
Abbildung 3	Schematische Darstellung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems.....	11
Abbildung 4	Wirkung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems auf Keratinozyten und Endothelzellen dermalen Blutgefäße.....	15
Abbildung 5	Parakriner Regelkreis zwischen Keratinozyten und Fibroblasten.....	17
Abbildung 6	Expression des MET-Rezeptors in unverwundeter und verwundeter muriner Haut.....	38
Abbildung 7	Nachweis von HGF in unverwundeter und verwundeter muriner Haut.....	40
Abbildung 8	Schematische Darstellung des differentiellen Ansatzes zur Analyse der spezifischen und gemeinsamen Effekte von HGF, KGF und GM-CSF auf das Expressionsmuster von Keratinozyten.....	41
Abbildung 9	Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von HGF, KGF und GM-CSF in wildtyp und c-jun ^{-/-} Fibroblasten durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR.....	42
Abbildung 10	Morphologische Charakteristika primärer Keratinozyten-Kolonien in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur nach Behandlung mit HGF, KGF oder GM-CSF.....	45
Abbildung 11	Nachweis der Artspezifität von Primern mittels PCR Analyse.....	46
Abbildung 12	Relative Quantifizierung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene in primären Keratinozyten.....	49
Abbildung 13	Photometrische Quantifizierung und Qualitätskontrolle der drei Stunden nach Zytokinbehandlung isolierten Gesamt-RNA auf einem 1%igem RNA Gel.....	50
Abbildung 15	Vergleichende Darstellung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene von HGF und KGF sowie nicht regulierter Kontrollgene.....	57
Abbildung 16	Nachweis der Artspezifität von Primern mittels PCR Analyse.....	58
Abbildung 17	Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der qPCR quantifizierten mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene von HGF und KGF	61
Abbildung 18	Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der qPCR quantifizierten mRNA-Expressionsprofile nicht regulierter Kontrollgene ..	62

Abbildung 19	Nachweis der Artspezifität des anti-humanen uPAR-Antikörpers.....	64
Abbildung 20	Vergleichende Darstellung der Protein- und mRNA-Expression von uPAR und CTGF.....	65
Abbildung 21	Relative Quantifizierung der uPAR- und uPA-mRNA-Expression in HaCaT Zellen nach Behandlung mit HGF, KGF und GMCSF.....	66
Abbildung 22	Nachweis der Proteinexpression von uPAR und uPA in HaCaT Zellen.....	67
Abbildung 23	Proliferation von HaCaT Zellen nach Mitomycin C-Behandlung	68
Abbildung 24	Dokumentation des ‚scratchtest‘ von HaCaT Zellen ohne und mit neutralisierendem uPAR-Antikörper.....	69
Abbildung 25	Einfluß der uPAR-Neutralisierung auf die Migration von HaCaT Zellen nach Stimulierung mit HGF, KGF und GM-CSF.....	72
Abbildung 26	Nachweis der uPAR-mRNA-Expression in unverwundeter und verwundeter muriner Haut.....	74
Abbildung 27	Expression des uPA-Rezeptors in unverwundeter und verwundeter muriner Haut.....	76

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Charakteristische, am Wundheilungsprozeß beteiligte Zytokine.....	3
Tabelle 2	Versuchsaufbau zur differentiellen Analyse von HGF, KGF und GM-CSF in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur.....	43
Tabelle 3	Identifikation von gemeinsam oder spezifisch regulierten Zielgenen von HGF, KGF und GM-CSF.....	52
Tabelle 4	Daten der ‚GeneChip® Expression Array‘ ausgewählter, HGF-abhängig regulierter Gene.....	54
Tabelle 5	Daten der ‚GeneChip® Expression Array‘-Analyse ausgewählter, nicht durch HGF regulierter Gene.....	55

Tabellen der Array Auswertungen im Anhang:

Tabelle A	Zielgene von HGF in Versuch A.....	113
Tabelle B	Zielgene von KGF in Versuch A.....	116
Tabelle C	Zielgene von GM-CSF in Versuch A.....	117
Tabelle D	Zielgene von HGF in Versuch B.....	119
Tabelle E	Zielgene von KGF in Versuch B.....	120
Tabelle F	Zielgene von GM-CSF in Versuch B.....	124
Tabelle G	Zielgene von HGF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind.....	125
Tabelle H	Zielgene von KGF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind.....	126
Tabelle I	Zielgene von GM-CSF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind.....	126
Tabelle J	Zielgene von HGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind.....	127
Tabelle K	Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind.....	130
Tabelle L	Zielgene von GM-CSF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind.....	135
Tabelle M	Gemeinsame Zielgene von HGF und KGF.....	137

Tabelle N	Gemeinsame Zielgene von HGF und GM-CSF.....	139
Tabelle O	Gemeinsame Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF.....	140
Tabelle P	Spezifisch regulierte Zielgene von HGF, die nicht durch KGF reguliert werden.....	141
Tabelle Q	Spezifisch regulierte Zielgene von HGF, die nicht durch GM-CSF reguliert werden.....	142
Tabelle R	Spezifisch regulierte Zielgene von HGF, die nicht durch KGF oder GM-CSF reguliert werden.....	143

Abkürzungsverzeichnis

Akt	, <i>thymoma viral proto-oncogene 1</i> '
AP-1	, <i>adaptor-related protein complex 1</i> '
ATF2	, <i>activating transcription factor 2</i> '
Bad	, <i>Bcl2-agonist of cell death</i> '
cAMP	, <i>cyclic adenosine monophosphat</i> '
cdc42	, <i>cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)</i> '
Cbl	, <i>Casitas B-lineage lymphoma</i> '
CRKL	, <i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i> '
c-fos	, <i>c-fos oncogene</i> '
c-jun	, <i>c-jun oncogene</i> '
c-myc	, <i>v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i> '
c-raf	, <i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i> '
CRKL	, <i>v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like</i> '
CTGF	, <i>connective tissue growth factor</i> '
E-Cadherin	, <i>epithelial cadherin</i> '
EGF	, <i>epidermal growth factor</i> '
Elk-1	, <i>ets-like protein 1</i> '
eNOS	, <i>nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)</i> '
ERK1/2	, <i>extracellular signal-regulated kinase 1 and 2 complex</i> '
Ets-1	, <i>erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1</i> '
FAK	, <i>focal adhesion kinase 1</i> '
Fas	, <i>Fas (TNF receptor superfamily, member 6)</i> '
FRA1	, <i>FOS-like antigen-1</i> '
Gab1	, <i>Grb2-associated binding protein 1</i> '
GM-CSF	, <i>colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)</i> '
Grb2	, <i>growth factor receptor-bound protein</i> '
HGF	, <i>hepatocyte growth factor</i> '
HIF-1	, <i>hypoxia-inducible factor 1</i> '
IFN γ	Interferon, gamma
IL-1	Interleukin 1
IL-18	Interleukin 18 (, <i>interferon-gamma-inducing factor</i> ')
IL-6	Interleukin 6 (, <i>interferon, beta 2</i> ')
IL-8	Interleukin 8
JunB	, <i>JunB oncogene</i> '
JunD	, <i>JunD oncogene</i> '
K10	, <i>keratin 10</i> '
KGF	, <i>fibroblast growth factor 7 (keratinocyte growth factor)</i> '
MAPK	, <i>mitogen-activated protein kinase</i> '
MAPK/JNK	, <i>mitogen-activated protein kinase 8</i> ' , , <i>c-jun N-terminal kinase</i> ,
MAPK/p38	, <i>mitogen-activated protein kinase 14</i> '
MEK1/2	, <i>mitogen-activated protein kinase kinase 1 and 2 complex</i> '
MET	, <i>hepatocyte growth factor receptor</i> '
MMP1	Matrix Metalloproteinase 1 (, <i>interstitial collagenase</i> ')
MMP10	Matrix Metalloproteinase 10 (, <i>stromelysin 2</i> ')
MMP2	Matrix Metalloproteinase 2 (, <i>gelatinase A, 72kDa gelatinase, 72kDa type IV collagenase</i> ')
MMP3	Matrix Metalloproteinase 3 (, <i>stromelysin 1, progelatinase</i> ')

MMP9	Matrix Metalloproteinase 9 (<i>,elatinase B, 92kDa gelatinase, 92kDa type IV collagenase‘</i>)
NF-κB	<i>,nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells‘</i>
PAK	<i>,p21-activated kinases‘</i>
PDGF	<i>,platelet-derived growth factor‘</i>
PI3-Kinase	<i>,phosphatidylinositol 3 kinase‘</i>
PKC	<i>,protein kinase C‘</i>
PLCγ	<i>,phospholipase C, gamma‘</i>
PTP	<i>,protein tyrosine phosphatase‘</i>
Rac	<i>,ras-related C3 botulinum toxin substrate‘</i>
Ras	<i>,rat sarcoma viral oncogene homolog‘</i>
Shc	<i>,Src homology 2 domain containing transforming protein‘</i>
Shp2	<i>,SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase-2‘</i>
SMAD4	<i>,mothers against DPP homolog 4 (Drosophila)‘</i>
Sos	<i>,son of sevenless homolog‘</i>
SP	<i>‘SP-family of transcription factors‘</i> (nach dem Aufreinigungsverfahren mit <u>S</u> ephacryl- und <u>P</u> hosphozellulose-Säulen benannt; Kadonaga et al., 1987)
STAT3	<i>,signal transducer and activator of transcription 3‘</i>
TGFβ	<i>,transforming growth factor, beta‘</i>
TGFα	<i>,transforming growth factor, alpha‘</i>
TIMP-3	<i>,tissue inhibitor of metalloproteinase 3‘</i>
TNFα	<i>,tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)‘</i>
TNFAIP3	<i>,tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3‘</i>
TPA	<i>,tetradecanoylphorbolacetate‘</i>
tPAR	<i>,tissue plasminogen activator receptor‘</i>
uPAR	<i>,urokinase plasminogen activator receptor‘</i>
VEGF	<i>,vascular endothelial growth factor‘</i>
Wnt	<i>,wingless-type MMTV integration site family‘</i>

1. Einleitung

Das Signaltransduktionssystem des Zytokins HGF (,hepatocyte growth factor') und seines Rezeptors MET (c-met, ,hepatocyte growth factor receptor') hat eine zentrale Wirkung auf epithelial-mesenchymale Interaktionen und die Koordination beteiligter Zellen sowohl während der Embryogenese als auch der Regeneration/Wundheilung im adulten Organismus (Rosen et al., 1994). Im Verlauf der Ontogenese ist die HGF/MET-Signaltransduktion unentbehrlich für die Ausbildung der Plazenta, Leber und Skelettmuskulatur (Birchmeier et al., 1997), mit embryonal letaler Folge bei HGF oder MET defizienten Tieren (Schmidt et al., 1995, Uehara et al., 1995).

Die Stimulation regenerativer Prozesse durch HGF/MET ist für Leber, Nieren, Lunge und Kornea beschrieben worden. So verläuft die Regeneration der Leber in Mausmodellen mit leberspezifischem HGF- wie auch MET-,knockout' verzögert (Phaneuf et al., 2004, Huh et al., 2004). Dabei führt das Fehlen der HGF-Expression im Lebergewebe zu einer verminderten Proliferation von Hepatozyten (Phaneuf et al., 2004). Die retardierten Heilungsprozesse bei Mäusen mit MET^{-/-} Hepatozyten beruhen dagegen auf einer eingeschränkten Migrationsfähigkeit und einer erhöhten Sensitivität gegenüber Fas-Rezeptor-vermittelter Apoptose (Huh et al., 2004). Auch in Niere, Lunge und Cornea beschleunigt das HGF/MET System die Proliferation und Migration epithelialer Zellen (Matsumoto et al., 1996, Vargas et al., 2000, Sakamaki et al., 2002, Sharma et al., 2003), einhergehend mit einer vermehrten Degradation extrazellulärer Matrix, welche nachweislich durch die Sekretion von Plasminogen Aktivatoren (uPA und tPA) und der Matrix Metalloproteinase 9 (MMP-9) bedingt ist (Gong et al., 2003, Daniels et al., 2003, Furuyama et al., 2004). Zusätzlich fördert das HGF/MET-Signaltransduktionssystem im regenerierenden Gewebe von Niere, Lunge und Cornea die Angiogenese (Rosen et al., 1993, Mori et al., 2003, Ishizawa et al., 2004), verhindert Apoptose (Yamasaki et al., 2002, Okada et al., 2004, Kakazu et al., 2004) und wirkt in Niere und Lunge entzündungshemmend (Gong et al., 2004, Ito et al., 2005).

Dagegen ist der konkrete Einfluß des HGF/MET-Signaltransduktionssystem auf die physiologische Regeneration der Epidermis und die kutane Wundheilung bislang nur unzureichend beschrieben. Auch die differentielle Wirkung von HGF auf Keratinozyten in Abgrenzung zu anderen Zytokinen ist völlig unbekannt.

1.1 Die Haut

Die Haut (Integument) kann in Abhängigkeit von der Körpergröße eine Fläche bis zu 2 m² erreichen und ist mit einem Siebtel des Körpergewichtes das schwerste Organ des Menschen. Zu den

Funktionen der Haut zählt die Aufrechterhaltung der Homöostase in Bezug auf Feuchtigkeit, Ionenhaushalt und Temperatur. Außerdem schützt sie sowohl vor Infektionen als auch vor mechanischen und chemischen Umwelteinflüssen. Schließlich dient die Haut als Sinnesorgan zur Perzeption von Temperatur, Berührung und Schmerz.

Diesen Funktionen wird die Haut morphologisch und funktionell aufgrund der Gliederung ihres Aufbaus in Cutis (Epidermis und Dermis) und Subcutis gerecht (Bucher et al., 1997). Hauptbestandteil der Dermis ist elastisches und kollagenfaseriges Bindegewebe, welches von Fibroblasten synthetisiert wird und gut innerviert und vaskularisiert vorliegt. Der Übergang zwischen Dermis und Epidermis ist beim Menschen papillär verzahnt und wird durch eine azelluläre Basalmembran getrennt. Hautanhangsgebilde der Epidermis (Haarfollikel, Hautdrüsen, Nägel) reichen tief in die Dermis hinein.

Die Epidermis ist ein mehrschichtiges, verhorntes Plattenepithel, das aus interfollikulären, transient amplifizierenden Keratinozyten des Stratum basale hervorgeht. Die Tochterzellen dieser basalen Keratinozyten differenzieren durch zunehmende Keratinproduktion zu abgestorbenen Hornplatten (terminale Differenzierung), wobei sie die weiteren Schichten der Epidermis (St. spinosum, St. granulosum und St. corneum) durchlaufen und nach etwa vier Wochen abgestoßen werden (physiologische Regeneration). Im St. basale kommen neben Keratinozyten, welche durch Hemidesmosomen in der Basallamina verankert sind, auch Melanozyten (Melaninsekretion) vor. Das St. spinosum weist zusätzlich auch Langerhanszellen (immunkompetente dendritische Zellen der Haut) und Merkelzellen (Mechanoperzeption) auf.

1.2 Die kutane Wundheilung

Die Regenerationsfähigkeit erwachsener Menschen ist im Gegensatz zu der von Föten reduziert, so daß es in Folge der kutanen Wundheilung zu einer Vernarbung mit verringerter Funktionalität kommt (Ferguson et al., 2004). Der Verlauf des Heilungsprozesses läßt sich in mehrere zeitlich ineinander greifende Stadien gliedern. Eingeleitet wird die Wundheilung durch die Bildung eines Thrombus, woraufhin die Entzündungs-, Proliferations- und schließlich die Narbenbildungsphase folgen (Abb. 1). Der Thrombus entsteht durch Thrombozytenaggregation und Aktivierung der Blutgerinnungskaskade. Infiltrierende Zellen des Immunsystems prägen die Entzündungsphase, wobei sie nekrotisches Gewebe phagozytieren und Infektionen entgegen wirken. Während der Proliferationsphase wird die fibrinogene Matrix des Thrombus durch regeneriertes Gewebe ersetzt, wobei Gewebe-synthetisierende Zellen innerhalb der Wundmatrix migrieren und proliferie-

ren. Dabei wird die Reepithelisierung durch Keratinozyten und die Genese des Granulationsgewebes durch Fibroblasten und Endothelzellen (Angiogenese) bewirkt. Im Verlauf dieser Wundheilungsstadien wird eine Reihe von parakrin und/oder autokrin wirkenden Zytokinen sezerniert, welche den Verlauf der Wundheilungsstadien koordinieren (Tab.1).

Tabelle 1: Charakteristische, am Wundheilungsprozeß beteiligte Zytokine

Zytokin	Quelle	vorrangige Wirkung und Zielzellen
IL-1	Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten	- stimuliert Chemotaxis von Leukozyten - aktiviert die Sekretion von Wachstumsfaktoren durch Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten
IL-6		- aktiviert T-Lymphozyten - hemmt Proliferation von Fibroblasten
IL-8	Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten	- aktiviert Neutrophile - stimuliert Migration von Makrophagen - hemmt Endothelzell-Leukozytenadhäsion
IFN γ	Lymphozyten	- aktiviert Makrophagen - hemmt Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen - hemmt Kollagenproduktion und -vernetzung
TNF α	Neutrophile, Makrophagen, Lymphozyten	- aktiviert die Sekretion von Wachstumsfaktoren durch Makrophagen, Fibroblasten, Keratinozyten
PDGF	Thrombozyten, Makrophagen, Endothelzellen	- stimuliert Chemotaxis von Neutrophilen, Makrophagen, Fibroblasten - stimuliert Proliferation und Kollagensynthese bei Fibroblasten
TGF β	Thrombozyten, Makrophagen, Lymphozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten	- stimuliert Migration und Kollagensynthese bei Fibroblasten - hemmt die Aktivierung von T-Lymphozyten, Makrophagen - hemmt Proliferation von Endothelzellen
TGF α	Thrombozyten, Makrophagen, Keratinozyten	- stimuliert Kollagensynthese von Fibroblasten - stimuliert Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten
EGF	Makrophagen, Keratinozyten	- stimuliert Proliferation von Fibroblasten, Endothelzellen, Keratinozyten
VEGF	Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten	- stimuliert Angiogenese
KGF	Fibroblasten	- stimuliert die Proliferation und Migration von Keratinozyten
GM-CSF	Keratinozyten, Fibroblasten	- stimuliert die Proliferation von Keratinozyten, Endothelzellen - stimuliert die Differenzierung von Keratinozyten

(verändert nach Schäffer et al., 1999 und Werner et al., 2003)

1.2.1 Die Bildung des Thrombus

Bei einer Verletzung (Abb. 1A) muß zunächst die Schutzfunktion der Haut aufrecht erhalten werden, wobei Flüssigkeits- und Elektrolytverlust sowie Infektionen verhindert werden müssen. Die Komplementkaskade (alternative Aktivierung) und der Thrombus (Abb. 1B) erfüllen diese Funktionen kurzfristig. Der Thrombus wird durch die parallel ablaufende primäre und sekundäre Hämostase gebildet. In der primären Hämostase vermitteln membranständige Glykoproteine von Thrombozyten die Adhäsion an freiliegendes Kollagen im Wundbereich (Thomas, 2002). Anschließend regt der Gerinnungsfaktor Thrombin die Degranulation und Aggregation der Thrombozyten an. Thrombin wird durch Aktivierung der Gerinnungskaskade während der sekundären Hämostase aktiviert und spaltet Fibrinogen in lösliches Fibrin, welches durch Koagulation ein

Netzwerk um die Thrombozytenaggregate spinnt. Weitere Bestandteile des Thrombus (Fibronektin, Vitronektin und Thrombospondin) stammen aus dem Blutplasma oder werden von Thrombozyten sezerniert (Gailit et al., 1994). Diese Matrix dient als Reservoir für Zytokine, welche zunächst von degranulierenden Thrombozyten und verletzten Zellen freigesetzt werden (Martin, 1997). Zu diesen Zytokinen gehören PDGF und $\text{TGF}\alpha$, die sowohl Zellen des Immunsystems als auch Keratinozyten, Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen aktivieren und rekrutieren (Tab. 1). Als provisorische Matrix ermöglicht der Thrombus außerdem die Migration dieser Zellen in das Wundmilieu hinein.

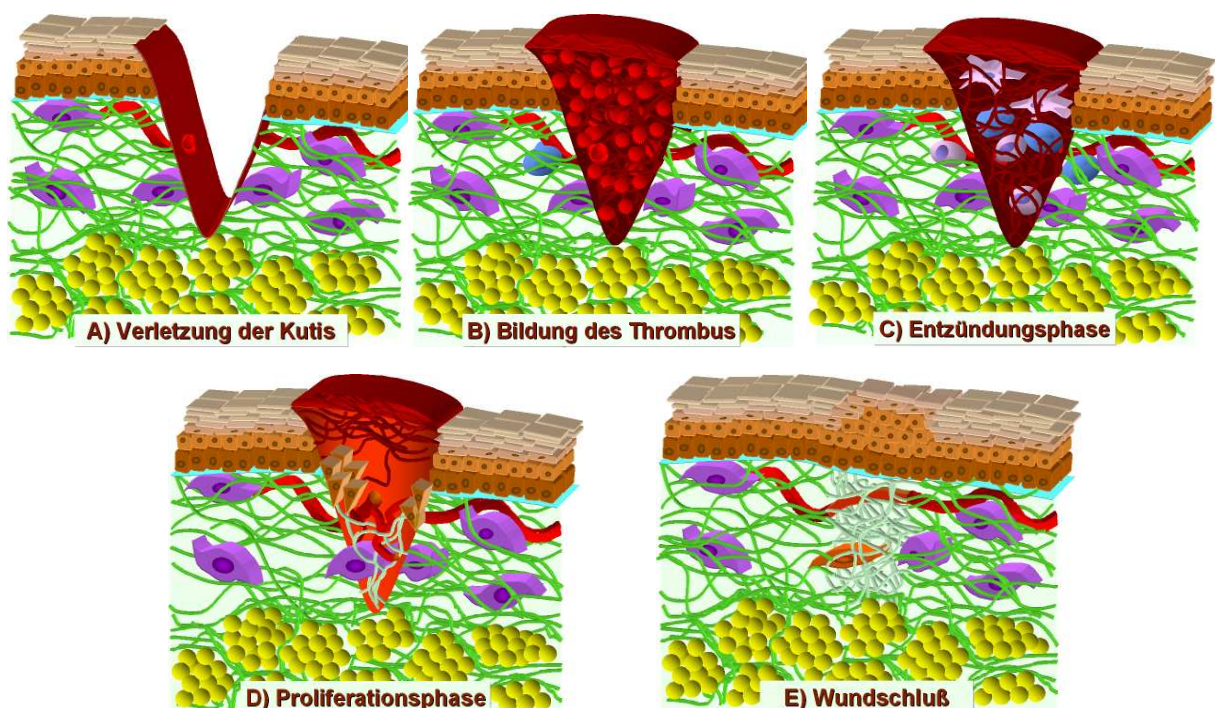


Abbildung 1: Stadien der kutanen Wundheilung

1.2.2 Die Entzündungsphase

Neutrophile Granulozyten sind die ersten Zellen der Entzündungsphase (Abb. 1C), welche durch PDGF sezernierende Thrombozyten chemotaktisch rekrutiert, binnen weniger Stunden in die provisorische Matrix migrieren (Deuel et al., 1982). Sie dienen nicht nur einem frühen Schutz vor Wundinfektion, sondern sezernieren ihrerseits Entzündungsmediatoren, welche Monozyten ab dem zweiten und Lymphozyten ab dem fünften Tag in großer Zahl rekrutieren (Deuel et al., 1982). Darüber hinaus sezernieren neutrophile Granulozyten Wachstumsfaktoren, welche die

Vorgänge der Proliferationsphase initiieren (Tab. 1). Monozyten differenzieren im Wundmilieu zu Makrophagen und phagozytieren nekrotisches Wundmaterial wie auch pathogene Keime (Leibovich et al., 1975). Außerdem unterstützen sie die Reepithelisierung und die Bildung des Granulationsgewebes, indem sie neben Wachstumsfaktoren auch Interleukine und Stickstoffmonoxid (NO) sezernieren (Schäffer et al., 1999).

1.2.3 Die Proliferationsphase

Bereits wenige Stunden nach der Verletzung beginnen Keratinozyten, Fibroblasten und vaskuläre Endothelzellen ihr Expressionsprofil zu verändern und sich in Richtung eines migratorischen Phänotyps zu entwickeln (Martin, 1997). Um in die provisorische Matrix einzuwandern, müssen diese Zellen entsprechende Oberflächenproteine (z.B.: Integrine und den Hyaluronsäurerezeptor CD44) exprimieren und mittels Proteasen die provisorische Matrix degradieren (Oksala et al., 1995, Gailit et al., 1994). Diese Morphogenese ist der zeitlimitierende Faktor für den Beginn der Proliferationsphase (McClain et al., 1996).

Die Reepithelisierung (Abb. 1D) wird vor allem durch KGF und EGF stimuliert. Ohne diese Wachstumsfaktoren kommt es zu einer Störung der Proliferation bzw. der Migration von Keratinozyten, was in Tiermodellen durch Inhibierung der jeweiligen Rezeptoren gezeigt werden konnte (Werner et al., 1994, Li et al., 2003). Die Reepithelisierung beginnt ein bis zwei Tage nach der Verwundung, indem sich basale Keratinozyten durch MMP2- und MMP9-vermittelte Proteolyse des Kollagens IV von der Basalmembran lösen (Makela et al., 1999). Die aktivierten epidermalen Keratinozyten unterwandern den Thrombus in Form einer Epithelzunge (*„migration tongue“*). Dafür werden Fibrin und Fibrinogen der provisorischen Matrix durch die proteolytischen Enzyme MMP2 (Makela et al., 1999) und Plasmin degradiert. Zusätzlich unterstützt Plasmin den Katabolismus der extrazellulären Matrix durch die Aktivierung von Metalloproteinasen (z.B.: MMP3 und MMP9; Murphy et al., 1999). Plasmin wird aufgrund der Sekretion von uPA und tPA aus Plasminogen im Thrombus gebildet (Castellino et al., 2005). Gleichzeitig lysieren Keratinozyten dermales Kollagen I und III, indem sie MMP1 sezernieren (Pichler et al., 1999). Eine Inhibierung der Plasminogen-Synthese verhindert die Migration der Keratinozyten in den Wundbereich (Romer et al., 1996).

Die Orientierung der migrierenden Keratinozyten zwischen provisorischer Matrix und Dermis gewährleisten die spezifischen Integrine $\alpha v \beta 6$ (Fibronectin) und $\alpha v \beta 5$ (Vitronectin; Martin, 1997). Hinter der Migrationsfront synthetisieren basale Keratinozyten die epidermalen Kompo-

nenten der Basallamina und bilden durch transiente Amplifikation unter Expression von MMP3 eine hyperplastische Epidermis (Pilcher et al., 1999). Durch Kontaktinhibition werden Migration und Proliferation bei Wundschluß eingestellt (Zegers et al., 2003), und die Keratinozyten der hyperplastischen Epidermis differenzieren unter dem Einfluß von GM-CSF zu einem mehrschichtigen Plattenepithel (Szabowski et al., 2000). Während der Reepithelisierung sezernieren Keratinozyten ihrerseits Mediatoren wie Interleukine, EGF und VEGF, wodurch sie die Proliferation und Migration sowohl autokrin von Keratinozyten als auch parakrin von Fibroblasten und Endothelzellen stimulieren (Singer et al., 1999).

Die Aktivierung von Fibroblasten erfolgt hauptsächlich durch PDGF und TGF β von Thrombozyten, Makrophagen und Endothelzellen, was zwei Tage nach dem Einsetzen der Reepithelisierung zu einer Proliferation von Fibroblasten an den Wundrändern und kurz darauf zur Migration in die provisorische Matrix führt (Abb. 1D; McClain et al., 1996, Werner et al., 2003). Durch Sekretion von Wachstumsfaktoren (z.B.: KGF und GM-CSF) stimulieren die aktivierten Fibroblasten die Proliferation und Migration von Keratinozyten und Endothelzellen. Darüber hinaus ersetzen sie die provisorische Matrix kontinuierlich durch die Bildung der azellulären Bestandteile des Granulationsgewebes. Dazu stellen Fibroblasten ein Gleichgewicht aus Matrix-Degradation mittels Sekretion von MMPs und Plasminogen Aktivatoren einerseits und Synthese von Hyaluronsäure, Proteoglykanen und Kollagen I und III andererseits her (Gailit et al., 1994). Die Kollagensynthese wird maßgeblich durch TGF β und die TGF β -vermittelte Induktion von CTGF stimuliert (Leask et al., 2003). Eine beeinträchtigte TGF β -Signaltransduktion führt bei Wundheilungsexperimenten mit Mäusen zu einer verminderten Kollagensynthese und infolgedessen zu einem reduzierten und weniger belastbaren Narbengewebe (Ferguson et al., 2004). Nach ungefähr einer Woche reduzieren Fibroblasten die Synthese von Kollagen (Eckes et al., 1996). Ein Teil der Fibroblasten transformiert unter der Expression von *‘ α smooth muscle actin’* zu Myofibroblasten (Shephard et al., 2004) und leitet durch Kontraktion die Bildung des Narbengewebes ein (Abb. 1E).

Die Angiogenese im Granulationsgewebe gewährleistet die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der regenerierenden Zellen im Wundbereich. Bei der Neovaskularisierung migrieren und proliferieren vaskuläre Endothelzellen vom Wundrand her unter Einfluß von NO und VEGF in das Granulationsgewebe (Howdieshell et al., 2001, Kane et al., 2001). Der wesentliche Einfluß von VEGF auf die Angiogenese zeigt sich bei *‘knockout’* von VEGF-A und dessen Rezeptoren VEGFR1 und VEGFR2 in Mäusen durch eine massiv gestörte Vaskularisierung mit embryonaler Letalität (Ferrara et al., 1996).

1.2.4 Die Bildung des Narbengewebes

Je nach Verletzungsumfang erfolgt der Wundschluß nach ungefähr zwei Wochen (Abb. 1E), wobei die Epidermis immer noch hyperplastisch ist (Singer et al., 1999). Die Zellzahl im ehemaligen Granulationsgewebe von Fibroblasten und Endothelzellen wird durch Apoptose drastisch reduziert (Desmouliere et al., 1995). Dennoch werden weiterhin kontinuierlich Kollagenfasern zunächst vom Typ III und später vom Typ I eingelagert. Diese Umgestaltung des Narbengewebes kann bis zu einem Jahr andauern, wobei die Kollagenfasern parallel organisiert werden und das Gewebe maximal 80% der Stabilität unverwundeter Haut erreicht (Martin, 1997, Schäffer et al., 1999).

1.3 Der Wachstumsfaktor HGF und sein Rezeptor MET

1.3.1 Vorkommen und Struktur von HGF und MET

HGF wird vorwiegend von mesenchymalen Zellen als inaktiver, glykosylierter ‚precursor‘ (94 kDa) sezerniert (Nakamura, 1991) und, an Proteoglykan gebunden, in der Basalmembran sowie der extrazellulären Matrix des Bindegewebes gespeichert (Yoshinaga et al., 1993). Infolge von Gewebeschäden wird dieser ‚precursor‘ extrazellulär aktiviert (Miyazawa et al., 1994). Dabei entsteht durch Proteolyse eine α - (69 kDa) und eine β -Kette (34 kDa), welche mittels Disulfidbrückenbindung den aktivierten, heterodimeren Wachstumsfaktor bilden (Nakamura et al., 1989, Abb. 2A). Dieser proteolytische Prozeß kann von verschiedenen Serinproteasen katalysiert werden, wie dem HGF-Aktivator (Kataoka et al., 2003), uPA und tPA (Mars et al., 1993) oder Gerinnungsfaktoren (Faktor Xa, XIa, XIIa) und Plasmakallikrein (Shimomura et al., 1995, Peek et al., 2002, Padiaditakis et al., 2002).

Als Ligand bindet aktiviertes HGF an die membranständige Rezeptor-Tyrosinkinase MET (Hartmann et al., 1992), welche hauptsächlich von Epithelzellen exprimiert wird und somit eine mesenchymal-epitheliale Interaktion ermöglicht (Stoker et al., 1987). Wie sein Ligand wird der Rezeptor zunächst als glykosylierter ‚precursor‘ (170 kDa) synthetisiert. Anschließend prozessiert die Serinprotease Furin den MET ‚precursor‘ intrazellulär in eine α - (50 kDa) und β -Kette (145 kDa; Mark et al., 1992, Komada et al., 1993), welche durch Disulfidbrückenbindung einen 190 kDa Komplex mit einer Halbwertszeit von 30 Minuten bis zu 5 Stunden bilden (Giordano et al., 1989, Moghul et al., 1994). Dieses Heterodimer besteht aus einem extrazellulären (α -Kette und N-terminaler Bereich der β -Kette), transmembranen und intrazellulären Bereich, letzterer mit

Tyrosinkinase Domäne (,activation loop') und Effektorbindestelle (,multiple docking site', Pon-zetto et al., 1994, Gherardi et al., 2003, Abb. 2B).

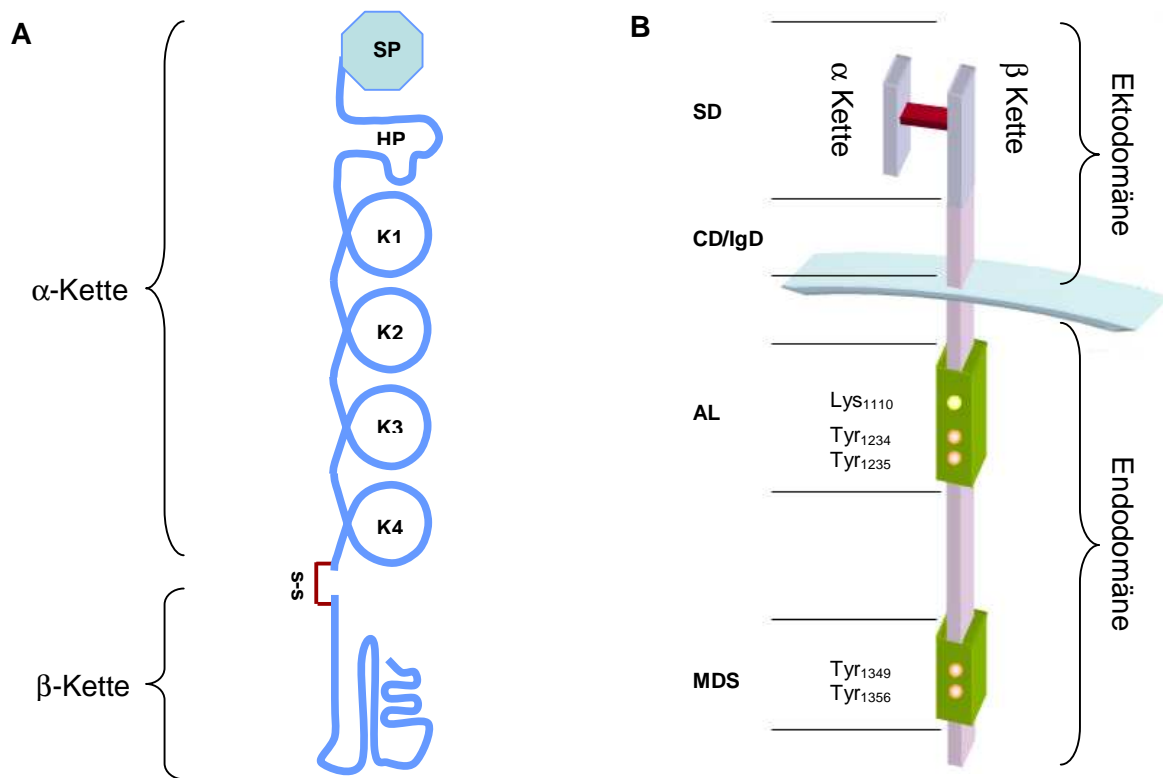


Abbildung 2: Schematische Darstellung von HGF und MET

A: Darstellung des aktivierten HGF Heterodimers (verändert nach Okigaki et. al. 1992)

SP: Signalpeptid, HP: ,N-hairpinloop', K1-K4: Kringel-Domänen

B: Darstellung der MET Rezeptor Domänen (verändert nach Gherardi et al., 2003)

Ektodomäne: SD: 'sema domain' aus α-Kette und N-terminaler Region der β-Kette, CD/IgD: Cystein-reiche Domäne und 4 repetitive Immunglobulin-Domänen, Endodomäne: AL: ,activation loop' / Tyrosin-Kinase Domäne, MDS: ,multisubstrate docking site'

1.3.2 Induktion der HGF- und MET-Expression

Eine kontinuierliche Expression von MET kann durch Transkriptionsfaktoren der SP-Familie reguliert werden (Zhang et al., 2003). Weiterhin wird die Proteinbiosynthese des Rezeptors durch Komponenten des Wnt-Signalweges wie auch durch p53 kontrolliert (Seol et al., 1999, Boon et al., 2002). Bei Hypoxie stimuliert der Angiogenesefaktor HIF-1 die MET-Expression (Pennac-

chietti et al., 2003, Scarpino et al., 2004). Außerdem induziert HGF die Expression seines eigenen Rezeptors in Abhängigkeit sowohl von AP-1 (Seol et al., 2000) als auch von Ets-1 (Gambarotta et al., 1996). Die Expression von HGF und die Expression von MET können durch die proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF α induziert werden (Zarnegar, 1995). Bei epithelialen Tumorzellen wird angenommen, daß auch die Expression von HGF durch das HGF/MET-Signaltransduktionssystem in einem autokrinen Regelkreis via Stat3 induziert werden kann (Elliott et al., 2002).

1.3.3 Rezeptoraktivierung und Degradation des HGF/MET-Komplexes

Bei der Interaktion von Ligand und Rezeptor bindet die HGF α -Kette mit hoher, die HGF β -Kette mit geringer Affinität an die Ektodomäne des MET-Rezeptors (Stamos et al., 2004). Die für die HGF-Bindung verantwortliche Struktur des MET-Rezeptors ist die ‚*sema domaine*‘ (Gherardi et al., 2003, Abb. 2B). Die vollständige Wirkung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems kann dabei nur durch das vollständige, heterodimere HGF-Molekül ausgelöst werden (Prat et al., 1998). Dennoch erzielen die natürlich vorkommenden N-terminalen Spleißvarianten NK1 und NK2 (aus ‚*hairpinloop*‘ und der ersten bzw. den ersten beiden Kringel-Domänen der α -Kette) als partielle Antagonisten einige biologische Effekte (Okigaki et al., 1992, Cioce et al., 1996).

Infolge der HGF-Bindung dimerisiert der MET-Rezeptor, wobei der verantwortliche Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Möglicherweise werden zwei Rezeptoren entweder von einem einzigem HGF-Molekül (2:1) oder von einem Liganden-Dimer (2:2) gebunden (Prat et al., 1998). Neuere Daten aus der Röntgenkristallographie untermauern das 2:2 Modell, wobei Heparin bzw. Heparan-Sulfat Proteoglykan die Bindung zwischen HGF und MET zu vermitteln und/oder zu stabilisieren scheint (Rubin et al., 2001, Gherardi et al., 2003, Stamos et al., 2004).

Darüber hinaus bildet der MET-Rezeptor nicht nur Homodimere, sondern interagiert auch mit zahlreichen membranassoziierten Molekülen (Integrine, CD44, PTP, E-Cadherin und β -catenin) sowie mit Rezeptoren (Fas-Rezeptor, Semaphorin 4D-Rezeptor, EGF-Rezeptor und Ron-Rezeptor; Villa-Moruzzi et al., 1993, Hiscox et al., 1999, van der Voort et al., 1999, Jo et al., 2000, Follenzi et al., 2000, Schwartz et al., 2002, Wang et al., 2002, Giordano et al., 2002).

Die Dimerisierung oder Oligomerisierung des MET-Rezeptors führt zur Aktivierung der katalytischen Untereinheit im intrazellulären Bereich der β -Kette (‚*activation loop*‘). Dabei findet eine Konformationsänderung statt, wodurch die ATP-Bindestelle des ‚*activation loops*‘ (humanes MET: Lys₁₁₁₀; Park et al., 1987) zugänglich wird (Chiara et al., 2003). Infolgedessen werden spe-

zifische Tyrosinreste innerhalb der katalytischen Untereinheit (humanes MET: Tyr₁₂₃₄ und Tyr₁₂₃₅, Longati et al., 1994) und der C-terminalen Effektorbindestelle („*multisubstrate docking site*“; humanes MET: Tyr₁₃₄₉/Tyr₁₃₅₆, Ponzetto et al., 1993) in *trans* oder in *cis* autophosphoryliert. Daraufhin können verschiedene „*downstream*“ Effektoren spezifisch an einen oder an beide phosphorylierte Tyrosinreste der „*multisubstrate docking site*“ binden (siehe Punkt 1.3.4). Aus sterischen Gründen ist dies pro Rezeptormolekül nur einem einzigen Effektor möglich (Stefan et al., 2001). Die Aktivierung von MET kann allerdings sowohl durch das Gangliosid GD1a als auch durch PKC inhibiert werden, welche einen Serinrest des MET-Rezeptors (Ser₉₈₅) phosphoryliert (Hyuga et al., 2001, Hashigasako et al., 2004).

Die Degradation des HGF/MET-Komplexes erfolgt nach Rezeptor-Aktivierung durch Cbl-vermittelte Ubiquitinisierung, Endozytose und anschließender proteosomaler Degradation (Petrelli et al., 2002). Allerdings wird der internalisierte Rezeptor nicht zwangsläufig degradiert, sondern kann auch im Endosom weiterhin den MAPK/ERK-Signalweg aktivieren und anschließend via Mikrotubuli zu perinukleären Kompartimenten transportiert und dort recycelt werden (Kermorgant et al., 2003 und 2004).

1.3.4 Das HGF/MET-Signaltransduktionssystem

Charakteristisch für das komplexe HGF/MET-Signaltransduktionssystem ist das Adaptorprotein Gab1. Es kann an pTyr₁₃₄₉ oder pTyr₁₃₅₆ der „*multisubstrate docking site*“ binden und vermittelt die Aktivierung der Agonisten wie Grb2/Sos, PI3-Kinase, Shc, Shp2, CRKL und PLC (Schäper et al., 2000, Gual et al., 2000). Einige dieser Effektoren können aktiviertes MET auch unabhängig von Gab1 binden, z.B. Grb2 an pTyr₁₃₅₆ und die PI3-Kinase an beiden Tyrosinresten (Ponzetto et al., 1993, Royal et al., 1997). Der gebundene Agonist wird phosphoryliert und setzt entsprechende Signalkaskaden in Gang (Ponzetto et al., 1994). Zu diesen Signalkaskaden gehören die MAPK/ERK-, die MAPK/p38-, die MAPK/JNK-, und die PI3-Kinase/Akt-Kaskade (Liang et al., 1998, Rodrigues et al., 1997, Fan et al., 2000, Recio et al., 2002, Abb. 3). Diese Signalwege können zur Aktivierung der Transkriptionsfaktoren Ets-1, Elk-1, STAT3, SMAD4, sowie der Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie c-jun, c-fos, JunB, JunD und ATF2 führen (Johnson et al., 1995, Paumelle et al., 2002, Recio et al., 2002, Tanimura et al., 2002, Mori et al., 2004, Tokumaru et al., 2005). Infolge der Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren kann HGF das Expressionsmuster von Zielzellen beeinflussen. Die ATF2-Aktivierung bewirkt zum Beispiel eine proliferative Antwort durch Induktion der Cyclin D1-Expression (Recio et al., 2002), die Aktivie-

rung von c-Fos und Elk-1 initiiert die Expression von MMP-9 (Tanimura et al., 2002) und durch die Aktivierung von Ets-1 können VEGF und MMP-1 sowie der MET-Rezeptor selbst (siehe Punkt 1.3.2) synthetisiert werden (Tomita et al., 2003). Dabei zählen sowohl die Transkriptionsfaktoren der AP-1 Familie c-Fos, c-jun, JunB und JunD, als auch das Onkogen c-Myc zu den ‚early response genes‘ des HGF/MET-Signaltransduktionssystems (Johnson et al., 1995). Weitere durch HGF/MET aktivierte Signalwege involvieren NF- κ B (Müller et al., 2002) oder PKC, welches auch den mikrotubulären Transport des MET-Rezeptors kontrolliert (Kermorgant et al., 2003 und 2004). Außerdem beeinflusst das HGF/MET-Signaltransduktionssystem die Umgestaltung des Zytoskeletts und wirkt auf Zell-Zell- wie auch Zell-Matrix Kontakte via PAK (Royal et al., 2000), c-Src/Fak/Paxillin (Rahimi et al., 1998, Liu et al., 2002) und nukleärer Translokation von β -catenin (Monga et al., 2002).

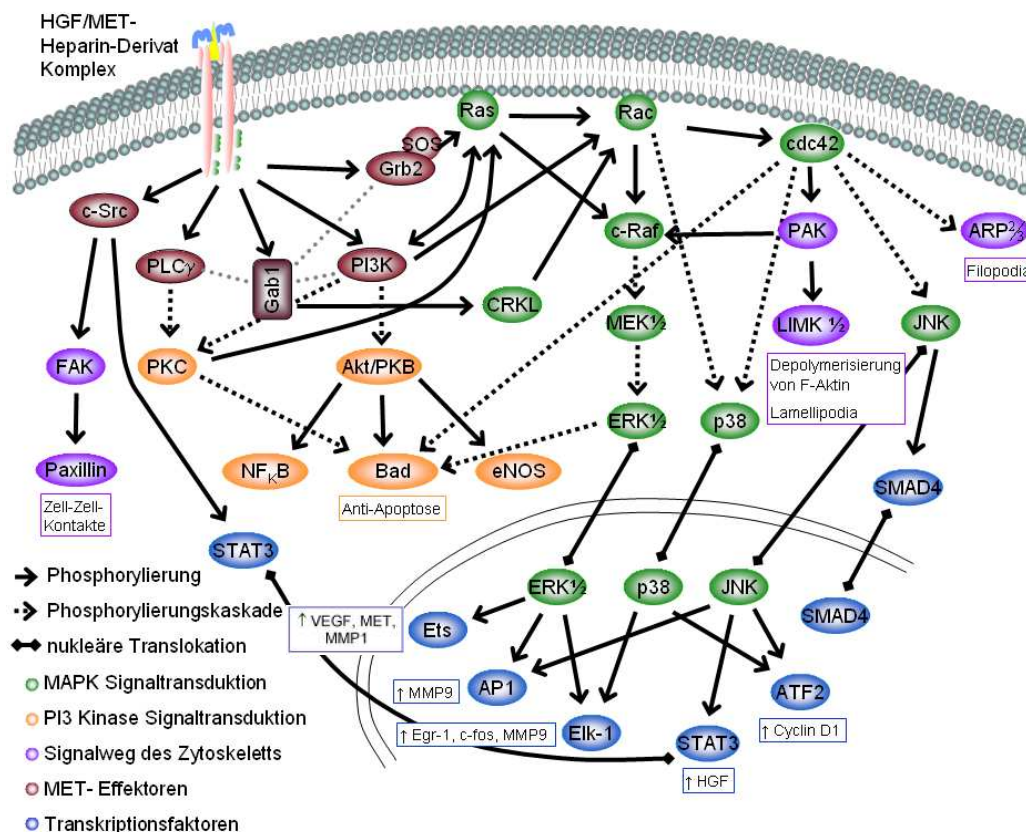


Abbildung 3: Schematische Darstellung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems

1.3.5 Funktionelle Aspekte der HGF/MET-Signaltransduktion in epithelialen Zellen

Durch die HGF/MET-induzierte Aktivierung unterschiedlicher Signalwege und ihre Wechselwirkungen untereinander werden verschiedene biologische Effekte auf Epithelzellen hervorgerufen (Abb. 3 und 4). Diese zellulären Antworten beinhalten die Stimulation der Proliferation (Weidner et al., 1993), den Schutz vor Apoptose (Fan et al., 2000) und weitere komplexe Vorgänge. Dazu zählt die Induktion von morphogenetischen Prozessen (Montesano et al., 1991), das invasive Wachstum in extrazelluläre Matrix (Bardelli et al., 1997) und das ‚*scattering*‘ (Stoker et al., 1985). Unter diesem Begriff versteht man die Dissoziation von Zellaggregaten unter Auflösung sämtlicher Zell-Zell Kontakte (‚*tight*‘-, ‚*adherens*‘-, ‚*desmosome*‘- und ‚*gap-junctions*‘, Potempa et al., 1998, Moorby et al., 1995), die Reorganisation des Zytoskeletts und Ausbildung von *Lamellipodia*, *Filopodia* und Membranfaltungen (Dowrick et al., 1991 und 1993, Royal et al., 2000), sowie die Expansion von Kolonien durch Migration (Gherardi et al., 1989, Ridley et al., 1995).

1.3.6 Molekulare Mechanismen der spezifischen Effekte des HGF/MET-Signaltransduktionssystems

Die genauen molekularen Mechanismen, welche infolge der Aktivierung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems zu der Auslösung eines spezifischen biologischen Effektes führen, konnten bisher nicht geklärt werden. Dies beruht sowohl auf dem unbekannten Ablauf der Rekrutierung und Aktivierung bestimmter Effektoren als auch auf der komplexen Wechselwirkung einzelner Agonisten untereinander (Abb. 3). Weiterhin führen Untersuchungen der verantwortlichen Signalwege für die Aktivierung der Proliferation oder des Apoptose-Schutzes in unterschiedlichen Zellsystemen zu konträren Ergebnissen. Zum Beispiel hat der MAPK/p38-Signalweg in Korneazellen im Gegensatz zu Melanomzellen keine Auswirkung auf die Proliferation (Recio et al., 2002, Sharma et al., 2003). Auch die Bedeutung von NF- κ B und der MAPK/ERK-Kaskade für die anti-apoptotische Wirkung variiert in unterschiedlichen Zellsystemen erheblich (Zeng et al., 2002, Kakazu et al., 2004, Tacchini et al., 2004). Tatsächlich scheint die Art der zellulären Antwort auf eine Aktivierung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems wie auch des verantwortlichen molekularen Mechanismus in Abhängigkeit vom Zelltyp zu stehen (Brinkmann et al., 1995, Day et al., 1999). Verantwortlich dafür kann ein zelltypspezifisches Expressionsmuster möglicher Dimerisierungspartner und Signaltransduktoren des MET-Rezeptors sein (Rubin et al., 2001, Bertotti et al., 2003).

Darüber hinaus wird die biologische Wirkungsspezifität des HGF/MET-Signaltransduktionssystems durch die Quantität phosphorylierter MET-Rezeptoren bestimmt (Boccaccio et al., 2002). Auch die HGF-Konzentration (Sponkel et al., 1994, Miura et al., 2003, Devarajan 2004), partielle Antagonisten (Otsuka et al., 2000, Michieli et al., 2002) und spezifische Mutationen des MET-Rezeptors (Giordano et al., 2000, Michieli et al., 2004) beeinflussen die Variabilität der zellulären Antworten, wobei sie die Phosphorylierungsrate von MET-Molekülen verändern.

1.3.7 Vorkommen und Expression von HGF und MET in der Haut

In der extrazellulären Matrix der Dermis kommt HGF als inaktiver ‚precursor‘ in großen Mengen an Heparin, Heparan- und Dermatan-Sulfat gebunden vor (Mizuno et al., 1994, Catlow et al., 2003). Diese Heparinderivate (Delehede et al., 2002) und in Keratinozyten auch der Hyaluronsäurerezeptor CD44v6 (Orian-Rousseau et al., 2002) haben sich als essentiell für die vollständige Aktivierung des MET-Rezeptors durch HGF erwiesen. Die Biosynthese und Sekretion von HGF erfolgt vorwiegend in der Dermis durch Fibroblasten (Matsumoto et al., 1992), aber auch durch Thrombozyten (Nakamura et al., 1987) und bei inflammatorischen Prozessen durch neutrophile Granulozyten (Grenier et al., 2002). Eine geringe Expression ist ebenfalls in Keratinozyten (Cowin et al., 2001) und vaskulären Endothelzellen (Tomita et al., 2003) beobachtet worden. Dabei induzieren die Entzündungsmediatoren TPA, TNF α , INF γ und IL-1 die HGF-Expression in dermalen Fibroblasten (Shimaoka et al., 1995, Takami et al., 2005), wobei IL-1 von Keratinozyten sezerniert wird (Szabowski et al., 2000). Dieser parakrine ‚feedback-loop‘ via IL-1 könnte somit die bereits bekannte aktivierende Wirkung von Keratinozyten auf die Expression von HGF in Fibroblasten erklären (Gron et al., 2002). Außerdem wird HGF in dermalen Fibroblasten durch Prostaglandine und cAMP induziert (Matsumoto et al., 1995, Gohda et al., 2000). TGF β reprimiert dagegen die HGF Biosynthese (Shimaoka et al., 1995).

Der MET-Rezeptor ist in der Haut membranär und zytoplasmatisch in Endothelzellen der dermalen Blutgefäße und im Bereich der Epidermis sowohl in basalen Keratinozyten, Melanozyten als auch in Langerhanszellen lokalisiert (Saitoh et al., 1994, Kurz et al., 2002). Weiterhin wird MET in infiltrierenden Zellen (Monozyten/Makrophagen; Chen et al., 1996, Beilmann et al., 1997, 2000) und Myofibroblasten (Cowin et al., 2001) exprimiert.

1.3.8 Molekulare und biologische Effekte des HGF/MET-Signaltransduktionssystems in der Haut

Die spezifische Wirkung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems auf Keratinozyten, Melanozyten und Endothelzellen der Haut wurde mittels HGF-Stimulationsversuchen gezeigt. Alle drei Zelltypen einschließlich primärer Keratinozyten reagieren auf HGF-Stimulierung mit gesteigerter Proliferation und verminderter Apoptose (Abb. 4; Matsumoto et al., 1991, Kunisada et al., 2000, Nakagami et al., 2002, Mildner et al., 2002, Sengupta et al., 2003). In immortalisierten HaCaT Zellen konnte dabei eine Abhängigkeit der Proliferation vom MAPK/ERK-Signalweg gezeigt werden (Delehedde et al., 2002). Indem HGF einerseits die Proliferation von Keratinozyten der äußeren Haarwurzelscheide stimuliert und andererseits einen chemotaktischen Effekt auf diese Zellen ausübt (Fujie et al., 2001), sind HGF sezernierende Fibroblasten der dermalen Papille an der Kontrolle des Haarzyklus beteiligt (Lindner et al., 2000).

Die anti-apoptotische Wirkung des Wachstumsfaktors erfolgt in primären Keratinozyten über den PI3-Kinase/AKT-Signalweg und ist unabhängig von der MAPK/ERK-Signaltransduktion (Mildner et al., 2002). Allerdings kann dieser HGF-Effekt im Gegensatz zur Proliferation bei den weitgehend Wachstumsfaktor-autonomen HaCaT Zellen nicht mehr beobachtet werden (Mildner et al., 1999).

Weiterhin kann HGF auch die Migration von Keratinozyten und Endothelzellen dermalen Blutgefäße induzieren (Abb. 4, Tsuboi et al., 1992, Zeigler et al., 1996a). In Keratinozyten ist dabei die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 von entscheidender Bedeutung (Tokumaru et al., 2005). Für die Initiierung migratorischer Prozesse müssen Zell-Zell Kontakte gelöst und die extrazelluläre Matrix degradiert werden. Die Auflösung der interzellulären Adhäsion zwischen Keratinozyten und Melanozyten wird über die HGF-vermittelte Aktivierung des MAPK/ERK- und des PI3-Kinase-Signalwegs erreicht, indem die Expression von E-Cadherin und Desmoglein-1 reduziert wird (Li et al., 2001). HGF fördert außerdem den Katabolismus extrazellulärer Matrixkomponenten durch Aktivierung von uPA und tPA in Keratinozyten (Sato et al., 1995).

Auch die Synthese von Matrix Metalloproteinasen trägt zur Degradation der extrazellulären Matrix und damit zur Induktion der Migration bei. So ist MMP-9 für die Dissoziation von Keratinozytenaggregaten erforderlich (McCawley et al., 1998) und wird von HGF über den MAPK/ERK-Signalweg induziert (Zeigler et al., 1999). Außerdem steigert die HGF-abhängige Aktivierung von PKC in Keratinozyten die Expression von MMP-1 und MMP-3 (Dunsmore et al., 1996). Dagegen wird eine Zunahme der Proteinbiosynthese von MMP-2 kontrovers diskutiert (Zeigler et

al., 1996b, Bennett et al., 2000). Zusätzlich wird eine temporäre Reduktion der Matrix-Degradation durch HGF-bedingte, transiente Induktion des MMP-Inhibitors TIMP-3 erörtert (Castagnino et al., 1998).

Weiterhin regt HGF Keratinozyten zur Expression des Angiogenesefaktors VEGF an (Gille et al., 1998). Die Induktion von VEGF wird durch Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors Sp1 ausgelöst, wobei der MAPK/ERK- und der PI3-Kinase-Signalweg sowie PKC involviert sind (Reisinger et al., 2003). Daß HGF gleichzeitig die Expression des VEGF-Rezeptors flk-1 in vaskulären Endothelzellen induziert, führt zu einer parakrinen Aktivierung der Angiogenese (Wojta et al., 1999). In den endothelialen Zellen des Gefäßsystems kommt es bei kombinatorischer Wirkung von HGF und VEGF zu einem synergistischen Effekt, wobei neben dem VEGF-Rezeptor auch HGF, MET und die pro-inflammatorischen Interleukine IL-1, IL-6 und IL-8 induziert werden (Gerritsen et al., 2003).

Schließlich stimuliert HGF die Morphogenese der Endothelzellen (Wojta et al., 1999) und die Differenzierung von Melanoblasten zu Melanozyten (Kunisada et al., 2000).

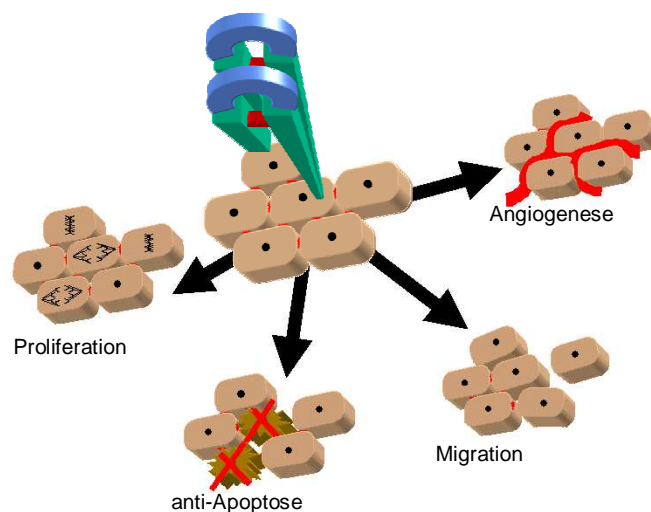


Abbildung 4: Wirkung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems auf Keratinozyten und Endothelzellen dermalen Blutgefäße

1.3.9 Das HGF/MET-Signaltransduktionssystem in der kutanen Wundheilung

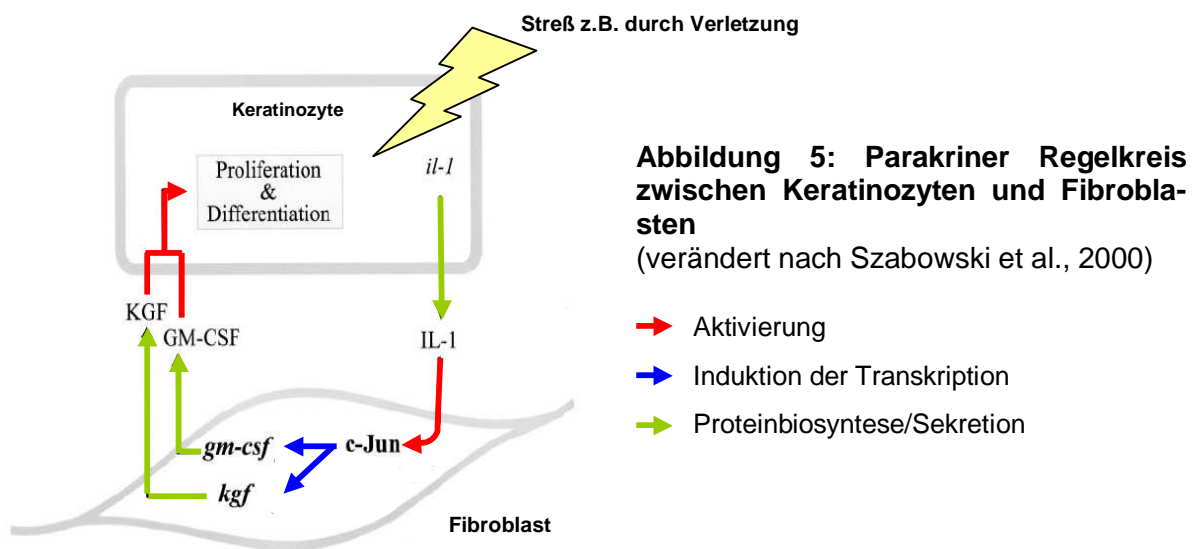
Die vielseitigen Wirkungen des HGF/MET-Signaltransduktionssystems auf Zellen der Haut deuten auf eine zentrale Funktion in den interaktiven Prozessen der kutanen Regeneration hin. Dies

zeigt sich bei chronischen Ulzera von Diabetikern, deren Heilung durch die Applikation von HGF deutlich verbessert werden konnte (Nayeri et al., 2002, 2005). In Wundheilungsexperimenten an Tiermodellen konnte nachgewiesen werden, daß sowohl die HGF- als auch die MET-Expression infolge einer Hautverletzung ansteigen. So konnte in Experimenten mit Ratten nachgewiesen werden, daß der MET-Rezeptor sein Expressionsmaximum in Keratinozyten am dritten Tag nach Verwundung aufweist (Cowin et al., 2001). Die HGF-Expression erreicht dagegen ihr Maximum am Tag sieben und tritt sowohl in dermalen Fibroblasten als auch in Keratinozyten auf (Cowin et al., 2001). Das Maximum der HGF- und MET-Synthese in Untersuchungen zur Wundheilung bei Mäusen liegt dagegen bereits am zweiten bis vierten Tag der Wundheilung vor, wobei die MET-Expression in Keratinozyten, Endothelzellen und Myofibroblasten nachweisbar ist (Yoshida et al., 2003).

Außerdem wurde die regenerationsfördernde Wirkung von HGF in verschiedenen Wundheilungsexperimenten bestätigt. So konnte einerseits nachgewiesen werden, daß die Regeneration durch Inaktivierung von HGF mittels neutralisierenden Antikörpern im Wundmilieu verzögert wird (Yoshida et al., 2003). Andererseits beschleunigt die exogene Applikation oder Überexpression des Wachstumsfaktors die Reepithelisierung, die Bildung des Granulationsgewebes und die Neovaskularisierung, was letztendlich zu einer Verkürzung der kutanen Wundheilung führt (Toyoda et al., 2001, Ono et al., 2004). An der Stimulierung der Reepithelisierung und Angiogenese während der Wundheilung ist die proliferative und migratorische Wirkung von HGF auf Keratinozyten und Endothelzellen maßgeblich beteiligt (Toyoda et al., 2001, Yoshida et al., 2003). Außerdem fördert HGF die Rekrutierung von neutrophilen Granulozyten, Monozyten und Mastzellen in die Wundregion (Beilmann et al., 2000, Bevan et al., 2004). Zusätzlich reduziert HGF die Narbenbildung, was auf eine verstärkte Degradation des Granulationsgewebes durch gesteigerte MMP-2 und MMP-9 Induktion, eine vermehrte Apoptose von Myofibroblasten und eine Inhibierung des Fibrosefaktors TGF β zurückzuführen ist (Yoshida et al., 2003, 2004, Nakanashi et al., 2002). Trotz dieser zahlreichen Versuche unter unphysiologisch erhöhten HGF-Konzentrationen ist die spezifische Wirkung von HGF auf Keratinozyten in Abgrenzung zu anderen Zytokinen noch nicht geklärt. Solche Analysen sind jedoch unerlässlich, um die gesonderte Funktion dieses Wachstumsfaktors bei der physiologischen Regeneration und der Wundheilung zu verstehen.

1.3.10 Die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur als realitätsnahes Wundheilungsmodell zur Analyse zytokinspezifischer Effekte

Der Einfluß von Zytokinen auf Keratinozyten in der Wundheilung kann möglichst nahe an der *in vivo* Situation analysiert werden, indem primär isolierte Keratinozyten *in vitro* mit entsprechenden Wachstumsfaktoren behandelt werden. Allerdings können primäre Keratinozyten nicht dauerhaft isoliert kultiviert werden, da sie grundsätzlich auf eine parakrine Stimulierung durch Fibroblasten angewiesen sind. Deshalb müssen die primären Keratinozyten mit Fibroblasten kokultiviert werden. Dadurch ist jedoch die Ursache-Wirkungs-Beziehung bei Stimulationsversuchen mit exoge-



nen Zytokinen nicht eindeutig, weil Wechselwirkungen und kompensatorische Effekte mit endogenen Wachstumsfaktoren (Sekretion durch Fibroblasten) auftreten können. Somit ist es problematisch, in der Kokultur die spezifische Auswirkung eines bestimmten Zytokins auf die Genexpression von Keratinozyten von den Auswirkungen der durch die Fibroblasten sezernierten Zytokine zu trennen. Um dieses Problem zu umgehen, bietet sich eine heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur aus humanen primären Keratinozyten und murinen *c-jun*^{-/-} Fibroblasten an (Szabowski et al., 2000, Maas-Szabowski et al., 2001). Aufgrund der fehlenden *c-jun*-Expression sind diese Fibroblasten in ihrer AP-1-abhängigen Zytokin-Synthese und -Sekretion beeinträchtigt (Abb. 5). Infolgedessen ist der epithelial-mesenchymale Regelkreis, in dem Keratinozyten die Fibroblasten durch IL-1 Sekretion zur Ausschüttung von Wachstumsfaktoren (KGF und GM-CSF) anregen, unterbrochen (Szabowski et al., 2000, Angel et al., 2001, 2002).

Damit reduziert der $c\text{-jun}^{-/-}$ Genotyp der Fibroblasten den Einfluß endogener Zytokine (KGF, GM-CSF), wodurch die Transparenz der Ursache-Wirkungs-Beziehung bei Stimulationsversuchen mit exogenen Zytokinen erheblich erhöht wird. Die Reduktion der Bioverfügbarkeit von Zytokinen in der ‚feeder-layer‘ Kokultur ist daher eine wichtige Voraussetzung für die Analyse eines kausalen und linearen Zusammenhangs zwischen der Stimulierung mit einem bestimmten Zytokin und der Genregulation in den Keratinozyten.

Auch HGF unterliegt der Regulation durch IL-1 (Zarnegar, 1995), möglicherweise in Abhängigkeit von AP-1, so daß die HGF-Expression in $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten wahrscheinlich beeinträchtigt ist. Somit könnte in diesem *in vitro* Modell der isolierte Effekt des HGF/MET-Signaltransduktionssystems ohne sekundäre und kompensatorische Wirkungen anderer Wachstumsfaktoren (z.B. KGF, GM-CSF oder TGF α) beobachtet werden. Außerdem erlaubt die ‚feeder-layer‘ Kokultur im heterologen Ansatz eine Diskriminierung der Expressionsmuster von humanen Keratinozyten und murinen Fibroblasten durch Hybridisierung mit artspezifischen Oligonukleotiden auf ‚GeneChip® Expression Arrays‘ (Affymetrix) bzw. mit artspezifischen Primern in der semiquantitativen ‚realtime‘ PCR oder artspezifischen Antikörpern im Western Immunoblot.

Somit wurde dieses Kokultur-Modell eingesetzt, um der zentralen Frage nachzugehen, welche Auswirkung das HGF/MET-Signaltransduktionssystem auf die Genexpression von Keratinozyten in der kutanen Wundheilung hat.

2 Zielsetzung

Die kutane Wundheilung und die physiologische Regeneration der Haut werden durch zahlreiche Wachstumsfaktoren mit redundanten aber auch exklusiven biologischen Wirkungen koordiniert (Werner et al. 2003). Dabei ist der spezifische Effekt von HGF auf das Transkriptom von Keratinozyten in Abgrenzung zu anderen Zytokinen bislang unzureichend untersucht worden. Dies ist aber notwendig, um die Prozesse der physiologischen Regeneration und der Wundheilung besser zu verstehen. Daher wird mit dieser Arbeit das Ziel verfolgt, sowohl die spezifischen Auswirkungen des HGF/MET Signalweges im Vergleich zu Signalwegen von KGF und GM-CSF auf das Expressionsmuster von primären Keratinozyten zu analysieren, als auch daraus resultierende mögliche funktionale Konsequenzen während der Wundheilung aufzuzeigen.

Als Grundvoraussetzung für die Analysen des HGF/MET Signaltransduktionssystems in der kutanen Wundheilung wird zunächst die Expression von MET in Keratinozyten bei gleichzeitiger Bioverfügbarkeit von HGF bestätigt. Danach wird die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur aus primären humanen Keratinozyten und murinen wildtyp oder c-jun^{-/-} Fibroblasten als Wundheilungsmodell für die Stimulierungsversuche mit den wundheilungsrelevanten Zytokinen HGF, KGF und GM-CSF etabliert. Die Auswirkungen von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf das mRNA-Expressionsmuster von Keratinozyten wird mittels ‚GeneChip® Expression Array‘-Analysen untersucht. Die Regulation der identifizierten, spezifischen und gemeinsamen Zielgene dieser Zytokine wird anschließend exemplarisch anhand ausgewählter Gene sowohl auf Transkriptions- (semiquantitative ‚realtime‘ PCR) als auch auf Proteinebene (Western Immunoblot) verifiziert. Durch funktionelle Analysen (z.B.: Migrationstest) am Beispiel eines im Wundheilungskontext bedeutenden Zielgenes werden die Konsequenzen der zytokinabhängigen Genregulationen untersucht. Schließlich soll ebenfalls an diesem Zielgen beispielhaft die biologische *in vivo* Relevanz der zytokinbedingten Genregulationen bestätigt werden, indem dessen Expression in murinen Wundheilungskinetiken durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR und immunhistochemische Färbungen nachgewiesen wird.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Analysen sollen somit den Grundstein für weiterführende Experimente legen, um basierend auf den generierten Array-Expressionsdaten die biologische Funktion und den Stellenwert von HGF im Vergleich zu anderen wichtigen Zytokinen in der Wundheilung zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Chemikalien

- Standardchemikalien (soweit nicht anders vermerkt)	Bio-Rad (München) BD-Biosciences (Heidelberg) DakoCytomation (Hamburg) Merck (Darmstadt) Roche (Mannheim) Roth (Karlsruhe) Sigma (Deishofen) Fermentas (St. Leon-Rot)
- Enzyme+Puffer, dNTPs, Randomprimer (soweit nicht anders vermerkt)	
- vollentsalztes Wasser für Lösungen (Reinstwassersystem Ultra Clear/Integra)	SG Wasseraufbereitung und Regenerierstation (Barsbüttel)
- ultraPure™ RNase freies Wasser für die semi-quantitative ‚ <i>realtime</i> ‘ PCR	Invitrogen (Karlsruhe)
- Medien und Reagenzien für die Zellkultur	PAA Laboratories (Cölbe) Biochrom AG (Berlin) tebu-bio (Offenbach)
- Wachstumsfaktoren	
- Cell Proliferation Biotrak™ ELISA	Amersham Bioscience (Freiburg)
- NucleoSpin® RNA II	Macherey-Nagel (Düren)
- ECL plus Western Blotting Detektionssystem	Amersham Biosciences (Freiburg)
- Plastikwaren Zellkultur	Greiner (Nürtingen) Falcon (Heidelberg) Nunc™ (Wiesbaden) TPP® (Basel, Schweiz)
- Pipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße	Eppendorf (Hamburg) Greiner (Nürtingen)
- Objektträger, Deckgläser	Engelbrecht (Edermünden)
- Filme für Western Immunoblot	Kodak® (Stuttgart)

3.2 Geräte

- Lamina Flow (Microflow)	Nunc™ (Wiesbaden)
- Brutschrank (Hera cell 150)	Heraeus (Hanau)
- inverses Mikroskop (Axiovert 25)	Zeiss (Jena)
- Mikroskop (Axiphot)	Zeiss (Jena)
- Digitales Kamerasystem (ProgResC14)	Jenoptik (Jena)
- Zentrifugen (Micro200, Universal32R)	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen)
- Taumelschüttler (BiometraWT17)	Biometra (Göttingen)
- Wärmeschrank	Binder (Tuttlingen)
- Mikrowelle	Panasonic (Hamburg)
- Mikrotom (SM 200R)	Leica (Solms)
- ABI Prism® 7300 Real Time PCR System	Applied Biosystems (Darmstadt)
- PCR Block (MultiCycler PTC)	Biozym (Oldendorf)
- Photometer (NanoDrop® ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer)	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
- pH Meter (pH210 Microprocessor pH Meter)	Hanna Instruments (Kehl am Rhein)

- ‚ELISAreader‘ (Multiscan Ascent) Thermo Electron Corporation (Dreieich)
- Agarosegelelektrophorese Zubehör Keutz (Reiskirchen)
- Geldokumentationssystem (Alpha Manager™) Biozym (Oldendorf)
- Acrylamidgelelektrophorese Zubehör Biozym (Oldendorf)
- Western Blot Apparatur (LKB Multiphor II) Pharmacia/Pfizer Pharma (Karlsruhe)
- Entwicklungsmaschine (Optimax Typ TR) MS Laborgeräte (Heidelberg)

3.3 Antikörper

Erstantikörper	Antigen	Ig Klasse	ausgetestete Verdünnung	
			IHC	WB
C-28 (Santa Cruz Biotechnology)	humanes und murines MET	Kaninchen IgG	2 µg/ml	-
H-145 (Santa Cruz Biotechnology)	humanes und murines HGF	Kaninchen IgG	2 µg/ml	-
AF807(R&D Systems)	humanes uPAR	Ziege IgG	10 µg/ml	0,1 µg/ml
MAB660 (R&D Systems)	humanes CTGF	Maus IgG ₁	-	1 µg/ml
MAB1310(R&D Systems)	humanes uPA	Maus IgG _{2a}	-	1 µg/ml
AF534(R&D Systems)	murines uPAR	Ziege IgG	10 µg/ml	-
Actin Ab-1 (Oncogene/Merck)	humanes und murines Aktin	Maus IgM	0,01 µg/ml	-

biotinylierte Zweitantikörper (DakoCytomation)	Epitop	ausgetestete Verdünnung		Normalserum (DakoCytomation)
		IHC	WB	
Schwein anti-Kaninchen (E0353)	Kaninchen IgG	1:200	-	X0901
Kaninchen anti-Maus (E0464)	Maus IgG	1:300	1:3000	X0902
Kaninchen anti-Ziege (E0466)	Ziege IgG	1:250	1:2500	X0902
Ziege anti-Maus (401225, Oncogene/Merck)	Maus IgM	-	1:10.000	-

3.4 Oligonukleotide

Die Synthese der Primer für die semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR wurde von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) und Thermo Electron Corporation (Ulm) durchgeführt. Um bei der Präparation der Gesamt-RNA und damit der cDNA-Synthese eine genomische Kontamination erkennen zu können, wurden die Primerpaare auf benachbarten Exonen lokalisiert. Die Berechnung der Schmelzpunkte (TM) und der GC-Gehalte (% GC) erfolgte mit der Primer Express® Software v2.0 (Applied Biosystems, Darmstadt).

humane Primerpaare (Sequenz: 5' → 3') und ,gene bank accession no.‘	Position	TM	%GC	Geradengleichung der qPCR mit Korrelations- koeffizient (R ²)
<i>VEGF</i> AF022375 CTTGCCTTGCTGCTCTACC CACACAGGATGGCTTGAAG	735-754 936-917	54,9°C 53,6°C	57,9 52,6	$y = -3,5311x + 18,8555$ $R^2 = 0,996$
<i>MMP10</i> NM_002425 TTCCGCCTTTTCGCAAGATG AAGCAGGATCACACTTGGCTG	764-782 900-879	60,8°C 58,9°C	52,6 52,4	$y = -3,2741x + 24,9395$ $R^2 = 0,995$
<i>IL-18</i> AF077611 ATGGCTGCTGAACCAGTAGAAGAC TAGAGGCCGATTTCTTGGTC	1-24 195-174	59,8°C 59,1°C	50,0 52,4	$y = -3,1605x + 25,6924$ $R^2 = 0,991$
<i>FRA1</i> BC016648 GGAAGGAACTGACCGACTTCC CCTCCTTGGCTCCTTCCG	422-443 587-569	58,6°C 59,3°C	57,1 66,7	$y = -3,3401x + 17,8917$ $R^2 = 0,997$
<i>CTGF</i> M92934 CCAAGGACCAAAACCGTGG CTGCAGGAGGCGTTGTTCAT	635-653 816-797	58,3°C 58,4°C	61,1 57,9	$y = -3,0086x + 23,6438$ $R^2 = 0,992$
<i>TNFAIP3</i> NM_006290 ACAGAAACATCCAGGCCACC GAACGCCCCACATGTACTGAG	275-295 413-392	58,4°C 59,1°C	55,0 57,1	$y = -3,4836x + 16,2439$ $R^2 = 0,993$
<i>uPAR</i> AY029180 ATCGTGCGCTTGTGGGAA AACCTCGGTAAGGCTGGTGAT	194-212 320-299	59,8°C 58,6°C	55,6 52,4	$y = -3,2609x + 15,6364$ $R^2 = 0,995$
<i>Keratin 10</i> NM_000421 CAAAGATGCTGAAGCCTGGTTC CTGCCAAGGAGGCTTCCA	1009-1031 1194-1176	59,8°C 58,5°C	50,0 61,1	$y = -3,1327x + 17,9040$ $R^2 = 0,997$
<i>Involucrin</i> NM_005547 CCAGGTCCAAGACATTCA GGTTGGCACTGGACAATA	1696-1714 1987-1969	50,9°C 51,0°C	50,0 50,0	$y = -3,2508x + 21,8976$ $R^2 = 0,994$
<i>Calreticulin</i> AY047586 GCCTGCCGTCTACTTCAAGG GCTGAAAGGCTCGAATGG	107-127 309-289	58,5°C 58,7°C	60,0 55,0	$y = -3,5180x + 18,6462$ $R^2 = 0,996$
<i>GAPDH</i> AB062273 GGCTGCTTTTAACTCTGGTA CTTGACGGTGCCATGGAATT	112-132 236-215	51,3°C 59,4°C	45,0 50,0	$y = -3,9574x + 14,0505$ $R^2 = 0,99$
<i>uPA</i> K03226 TTGCTCACCACAACGACATTG CAGCTTGTGCCAAACTGGG	889-910 1018-999	59,2°C 58,9°C	47,6 57,9	$y = -3,4784x + 18,7129$ $R^2 = 0,991$

murine Primerpaare (Sequenz: 5' → 3') und ,gene bank accession no.'	Position	TM	%GC	Geradengleichung der qPCR mit Korrelations- koeffizient (R ²)
<i>HGF</i> X84046 TTC CAG CCA GAA ACA AAG ACT TG CCT TGC CTT GAT GGT GCT GA	1650-1673 1996-1976	59,4°C 60,7°C	43,5 55,0	$y=-3,3601x+22,3285$ $R^2=0,999$
<i>KGF</i> AK037172 (Szabowski et al., 2000) CTGGCCTTGTCACGACCTTGTTTCT CCCTTTCACCTTGCCTCGTTTGTC	224-248 726-702	64,5°C 63,9°C	54,2 50,0	$y=-3,6715x+22,7142$ $R^2=0,994$
<i>GM-CSF</i> X02333 (Szabowski et al., 2000) ATCAAAGAAGCCCTAAACCTCCTG CTGGCCTGGGCTTCCTCATT	279-303 614-594	59,9°C 62,3°C	45,8 60,0	$y=-2,8764x+21,3455$ $R^2=0,991$
<i>beta Tubulin</i> AK011263 (Schorpp-Kistner et al., 1999) TCACTGTGCCTGAACTTACC GGAACATAGCCGTAAACTGC	1027-1047 1344-1324	52,3°C 53,8°C	50,0 50,0	$y=-2,9511x+15,6529$ $R^2=0,998$
<i>uPAR</i> BC010309 GTTGCTGGCGACTACCTGTGT GAGCCCATGCGGTAATCAT	43-64 261-241	58,9°C 58,6°C	57,1 55,0	$y=-3,3113x+19,0402$ $R^2=0,996$

3.5 Analysen der murinen, kutanen Wundheilung

3.5.1 Wundheilungsexperimente und Herstellung der Schnittpräparate

Die in Paraffin eingebetteten murinen Wunden stammen von C57BL/6J Mäusen aus dem Tierstall des Verfügungsgebäudes der Universität Mainz (Langenbeckstraße 1, Mainz; AG Blessing). Jedem der Versuchstiere (n=5) wurden jeweils 3 dorsale ,full-thickness' Wunden, welche die Epidermis, Dermis und Subcutis umfassen, mit einem Durchmesser von 4 mm in die enthaarte Rückenhaut gestanzt. Am 4., 6., 8., 10. und 16. Tag nach Verwundung wurden diese Mäuse und unverwundete Kontrolltiere (n=2) schmerzfrei durch cerebrale Dislokation getötet. Mit einem Abstand von 2 mm wurden die Wunden exzidiert, in 4% Formaldehyd/PBS fixiert, in Paraffin eingebettet und für immunhistochemische Analysen mit einer Dicke von 4 µm geschnitten.

3.5.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus Wundgewebe

Die Gesamt-RNA der murinen Wundheilungskinetik wurde von Dr. Axel Szabowski (AG Prof. Dr. P. Angel, Div. A100 Signal Transduction & Growth Control, Deutsches Krebsforschungszentrum) zur Verfügung gestellt. Die Exzision der Wunden fand zu den Zeitpunkten 6 Stunden, 1 Tag, 2 Tage, 5 Tage und 7 Tage im Anschluß an die Wundsetzung statt.

3.6 Zellkultur

Alle Zellen wurden bei 37°C und einer Feuchtigkeit von 95% unter Begasung mit 5% CO₂ kultiviert. Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl einer Zellsuspension in eine Zählkammer nach Neubauer pipettiert. Aus der Zellzahl von vier Großquadraten der Zählkammer (pro Großquadrat: 0,1 mm³) wurde ein Mittelwert gebildet. Dieser Mittelwert $\times 10^4$ entspricht der Zellzahl in einem Milliliter der eingesetzten Zellsuspension.

3.6.1 Kultivierung der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur

Die Arbeiten mit der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur erfolgten in enger Zusammenarbeit mit Dr. Axel Szabowski und Julia Knebel (AG Prof. Dr. P. Angel, Div. A100 Signal Transduction & Growth Control, Deutsches Krebsforschungszentrum). Die humanen primären Keratinozyten und Fibroblasten stammen von Biopsien gesunder Körperhaut (Chirurg Dr. Gallenkämper, Klinik St. Elisabeth, Heidelberg).

Für das Anlegen der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur wurden die humanen primären Keratinozyten ($5 \times 10^4/\text{cm}^2$) mit bestrahlten (70 Gray, γ -Strahlung) humanen primären Fibroblasten ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) in FAD-Medium (10% FCS) vorkultiviert. Alle zwei Tage erfolgte ein Medienwechsel. Sobald die ‚feeder-layer‘ Vorkultur eine Konfluenz von ungefähr 80% erreichte, wurden die primären Keratinozyten isoliert. Dafür wurden die ‚Feeder‘-Zellen wiederholt mit 0,05% EDTA ‚abgewaschen‘. Anschließend wurden die primären Keratinozyten trypsiniert (0,4% Trypsin/0,025% EDTA) und mit $9,5 \times 10^2$ Zellen pro cm² wieder auf vorkultivierte ‚Feeder‘-Zellen ($1 \times 10^4/\text{cm}^2$) ausgesät. Die ‚Feeder‘-Zellen der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur wurden aus der Haut von murinen wildtyp Embryonen (wildtyp Fibroblasten) oder murinen c-jun^{-/-} Embryonen (c-jun^{-/-} Fibroblasten) entnommen. Die Bestrahlung der murinen Fibroblasten erfolgte mit 20 Gray (wildtyp Fibroblasten) oder mit 15 Gray (c-jun^{-/-} Fibroblasten). Ein Medienwechsel (FAD Medium, 5% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin) erfolgte alle zwei Tage. Das FAD Medium für die ‚feeder-layer‘ Kokultur bestand aus DMEM und Ham's Medium im Verhältnis von 4:1 (pH 7,3).

3.6.1.1 Stimulierungsversuche zur Analyse morphologischer Effekte

Die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur wurde wie beschrieben (siehe Punkt 3.6.1) mit vorkultivierten primären Keratinozyten in 56,7 cm² Zellkulturschalen ausgesät, wobei das FAD Medium einmalig mit HGF, KGF oder GM-CSF [jeweils 10 ng/ml] versetzt wurde. Nach zwei

Tagen erfolgte ein Medienwechsel ohne erneute Gabe von Zytokinen. Nach weiteren fünf Tagen wurde das Wachstum der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur digital dokumentiert.

3.6.1.2 Stimulierungsversuche zur Isolierung von Gesamt-RNA und zellulären Proteinextrakten aus primären Keratinozyten

Für die Isolierung der Gesamt-RNA wurde die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur (humane Keratinozyten und murine wildtyp oder c-jun^{-/-} Fibroblasten) nach Vorkultivierung der primären Keratinozyten (siehe Punkt 3.6.1) in 145 cm² Zellkulturschalen kultiviert. Sobald die Zellen eine Konfluenz von ungefähr 80% erreicht hatten, wurde das Medium mit den Zytokinen HGF, KGF und GM-CSF [10 ng/ml] versetzt. Drei Stunden später erfolgte die Isolierung der Gesamt-RNA (Versuch A, siehe Punkt 3.8.1). Für die Doppelbestimmung wurde dieser Versuch wiederholt (Versuch B).

Parallel zu Versuch B wurde die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur für die Proteinextraktion zusätzlich in 56,7 cm² Zellkulturschalen kultiviert, mit den entsprechenden Zytokinen stimuliert und nach sechs Stunden für die Isolierung der Proteinfractionen herangezogen (siehe Punkt 3.7.1).

3.6.2 Kultivierung der HaCaT Zell-Linie

Die Zellen der immortalisierten HaCaT Zell-Linie stammen aus dem Labor von Dr. Ingo Haase (Dermatologie, Universität zu Köln) und wurden in DMEM Medium mit 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin kultiviert. Für das Passagieren und das Aussähen einer definierten Zellzahl wurden die HaCaT-Zellen mit PBS gewaschen und anschließend in 1xTrypsin/EDTA bei 37°C für 5-10 Minuten inkubiert. Die gelösten Zellen wurden in Medium aufgenommen und mit definierter Zellzahl (zur Zellzahlbestimmung siehe Punkt 3.6) ausgesät. Für alle Stimulierungsversuche wurden die Zellen ohne Antibiotika kultiviert und der FCS-Gehalt entsprechend den Angaben reduziert (siehe Punkt 3.6.2.1 und 3.6.2.2).

3.6.2.1 Stimulierungsversuche zur Isolierung von Gesamt-RNA und zellulären Proteinextrakten aus HaCaT-Zellen

HaCaT Zellen wurden in zwei 6er Well-Platten (5x10⁵, bei 1% FCS) ausgesät. Nach ungefähr 40 Stunden hatten die Zellen eine Konfluenz von ca. 70% erreicht und je ein Well pro Platte wurde mit einem der drei Zytokine (HGF, KGF und GM-CSF je [10 ng/ml]) behandelt. Unbehandelte Zellen dienten als Kontrolle. Nach 3 Stunden erfolgte die Isolierung von Gesamt-

RNA aus den Zellen der ersten Platte (siehe Punkt 3.8.1) und nach 6 Stunden wurden Proteine aus den Zellen der zweiten Platte (siehe Punkt 3.7.1) isoliert.

3.6.2.2 Migrationstest

Um eine zytokininduzierte Migration der HaCaT Zellen ohne den Einfluß durch proliferative Effekte analysieren zu können, wurde die Proliferation von nicht mit Zytokinen behandelten Zellen inhibiert. Dafür wurden die Zellen in eine 24 Well Platte ausgesät (2×10^5 Zellen pro 24er Well), über Nacht inkubiert (DMEM Medium mit 1% FCS) und anschließend drei Stunden mit Mitomycin C behandelt [$5 \mu\text{g/ml}$]. Die Analyse der Proliferationshemmung wurde mit einem BrdU-ELISA durchgeführt. Als Kontrolle dienten Zellen, die ohne Mitomycin C und in DMEM Medium mit 1% FCS kultiviert wurden. Nach 24 Stunden wurde die Proliferationsrate mit einem ‚Cell Proliferation Biotrak™ ELISA‘ nach Herstellerangaben gemessen (Abweichungen: der Proliferationstest fand in einer 24 Well-Platte statt, so daß die Mengenangaben mit dem Faktor 5 multipliziert wurden, außerdem fand die Inkubation mit dem BrdU Antikörper bei 37°C statt).

Für den Migrationstest wurden HaCaT Zellen in 24 Well-Platten ausgesät (2×10^5 Zellen pro Well), in DMEM Medium (1% FCS) über Nacht inkubiert und mit Mitomycin C behandelt [$5 \mu\text{g/ml}$, 3 Stunden]. Unmittelbar nach der Mitomycin C-Behandlung wurde ein ‚scratch‘ mit einer Plastikpipettenspitze gesetzt. Die losgelösten Zellen wurden mehrfach mit PBS abgewaschen. Anschließend erfolgte die Behandlung mit den Zytokinen HGF, KGF und GM-CSF [jeweils mit 10 ng/ml] und dem neutralisierendem Antikörper gegen uPAR [$1,2 \mu\text{g/ml}$] nach folgendem Schema:

Versuchsansätze	ohne Zytokin	HGF [10 ng/ml]	KGF [10 ng/ml]	GM-CSF [10 ng/ml]
neutralisierender uPAR-Antikörper [$1,2 \mu\text{g/ml}$]	Well 1, 5, 9	Well 2, 6, 10	Well 3, 7, 11	Well 4, 8, 12
ohne Antikörper	Well 13, 17, 21	Well 14, 18, 22	Well 15, 19, 23	Well 16, 20, 24

Die durch den ‚scratch‘ entstandenen Ränder des Zellrasens wurden bei identischer Vergrößerung (40fach) nach dem Setzen des ‚scratches‘ (Stunde 0) und nochmals nach einer 18 stündigen Inkubation digital dokumentiert. Der Migrationsfaktor jedes Versuchansatzes (MF) wurde durch das Verhältnis der zellfreien Flächen zu Beginn des Experiments (Stunde 0) und den unbewachsenen Flächen nach 18 Stunden Inkubation normalisiert (a) und anschließend die Mittelwerte ($^{\text{MW}}$ MF) und Standardabweichungen ($^{\text{STABW}}$ MF) bestimmt. Anhand der ge-

mittelten Migrationsfaktoren wurde die relative Migrationsaktivität (rM) in Bezug zu den Werten unbehandelter Zellen (Referenzwerte) ermittelt. Da bei den nicht mit Zytokinen stimulierten Zellen keine Migration zu erwarten ist, ist das Zuwachsen des gesetzten ‚scratches‘ bei diesen Zellen ein Maß für trotz Mitomycin C-Behandlung stattfindende basale ‚Restproliferation‘. Deshalb wurden die Werte der relativen Migrationsaktivität nach Zytokinbehandlung von der basalen ‚Restproliferation‘ bereinigt (b). Die Fortpflanzung der Standardabweichung wurde nach gültigen statistischen Verfahren errechnet (Ewens et al., 2001).

- a) Migrationsfaktor nach Behandlung mit einem bestimmten Zytokin (X) und 18 stündiger Inkubationszeit:

$$MF_X = \frac{^{0h} \text{Fläche}_X}{^{18h} \text{Fläche}_X}$$

- b) Berechnung der bereinigten, durchschnittlichen, relativen Migrationsaktivität nach Behandlung mit einem bestimmten Zytokin (X):

$$rM = \frac{^{MW} MF_X}{^{MW} MF_{unbehandelt}} - 1$$

Standardabweichung der bereinigten, durchschnittlichen, relativen Mengeneinheit:

$$STABW = \sqrt{\left(\frac{^{STABW} MF_X}{^{MW} MF_X} \right)^2 + \left(\frac{^{STABW} MF_{unbehandelt}}{^{MW} MF_{unbehandelt}} \right)^2} \times \frac{^{MW} MF_X}{^{MW} MF_{unbehandelt}}$$

Die Signifikanz der Ergebnisse wurde mittels zweiseitigem Student t-Test (Signifikanzgrenze bei $p \leq 0,05$) in ‚Microsoft® Excel 97 SR-1‘ überprüft.

3.7 Protein-Analytik

3.7.1 Isolierung zellulärer Gesamt-Proteinextrakte

Zur Isolierung der Gesamt-Proteinfraktion wurden die Zellen (HaCaT Zellen oder Zellen aus der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur) zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in Lysispuffer [12 µl/cm² Fläche] mit einem Zellkulturschaber abgekratzt. Die Zellsuspension wurde in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt und sofort auf Eis gestellt. Durch mehrmaliges alternierendes Vortexen und Schockgefrieren (in flüssigem Stickstoff) wurden die Zellen lysiert. Die Zelltrümmer wurden durch einen Zentrifugationsschritt separiert (1 Minute, 12.000rpm) und anschließend die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Konzentrationsbestimmung der Überstände erfolgte photometrisch nach Reaktion mit einem

Coomassie-Blau-Reagent (Bradford Protein Test, siehe Punkt 3.7.2). Die Gesamt-Proteinextrakte wurden bei -20°C gelagert.

Lysispuffer zur Proteinisolierung (pH 8,0)

Triton x100	1% [v/v]
TrisHCl	20mM
NaCl	137mM
EDTA	2mM
Glyzerin	10%
Protease-Inhibitor Cocktail	1mM
(P2714, Sigma, Deishofen)	

3.7.2 Protein-Quantifizierung nach Bradford

Für die Konzentrationsbestimmung wurden die Proteinextrakte zu 10% und für eine Eichkurve auch bovines Serumalbumin (BSA, A3156, Sigma, Deishofen) in einer Konzentrationsreihe (5, 10, 15, 20 und 25 $\mu\text{g/ml}$) in Wasser verdünnt. Anschließend wurden die wässrigen Proteinlösungen jeweils mit 20% eines Coomassie-Blau-Reagents (Bradford Reagent B6916, Sigma, Deishofen) versetzt und nach einer Inkubation von 30 Minuten bei Raumtemperatur im Photometer (595nm) gemessen. Anhand der BSA-Eichgeradengleichung wurde die Proteinkonzentration der Extrakte errechnet.

3.7.3 Western Immunoblot

Die gelelektrophoretische Auftrennung (SDS-PAGE) der Gesamt-Proteinextrakte erfolgte in einem 10%igen Acrylamidgel bestehend aus Trenn- und Sammelgel (52cm^2 , bei 50mA für 15 Minuten und bei 100mA für eine Stunde). Anschließend wurden die Proteine auf eine mit Methanol vorbehandelte (2 Minuten) Membran (Immun-Blot™ PVDF Membran, BioRad Laboratories, München) transferiert (bei 1mA/cm^2 für 90 Minuten). Das Blockieren der unspezifischen Bindungen erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur in 1x TBST mit 5% Milchpulver auf einem Taumelschüttler, anschließend wurde der Erstantikörper hinzugefügt (Konzentration siehe Punkt 3.3, Inkubation bei 4°C auf Taumelschüttler, über Nacht). Die Membran wurde 3 mal in 1x TBST mit 5% Milchpulver gewaschen (je 15 Minuten) und anschließend erfolgte die Inkubation mit dem entsprechendem Zweitantikörper in 1x TBST mit 5% Milchpulver (Konzentration siehe Punkt 3.3, Inkubation bei Raumtemperatur auf Taumelschüttler, 1 Stunde). Nach drei weiteren Waschschritten mit 1x TBST wurde die Signaldetektion mit dem ‚ECL plus Western Blotting Detektionssystem‘ nach Herstellerangaben durchge-

führt. Die Belichtung der Kodak® Filme erfolgte in Abhängigkeit von der Signalstärke (5 bis 20 Minuten). Die Entwicklung der Filme wurde automatisch (Optimax) durchgeführt.

Für den Nachweis der Aktin-Expression als Ladekontrolle wurde die Membran über Nacht bei 4°C in 1xTBST gewaschen. Die Inkubation mit dem Erstantikörper gegen Aktin (Konzentration siehe Punkt 3.3) erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur in 1x TBST mit 5% Milchpulver. Nach drei Waschschritten mit 1xTBST wurde die Membran mit dem Zweitantikörper (Konzentration siehe Punkt 3.3) eine Stunde in 1x TBST mit 5% Milchpulver inkubiert und drei mal mit 1xTBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Signaldetektion mit der frisch angesetzten SignaldetektionslösungAB (2 minütige Inkubation bei Raumtemperatur), die Belichtung (10 bis 30 Sekunden) und die automatische Entwicklung der Filme.

Acrylamidgel (10%):**Trenngel****Sammelgel**

Acrylamid-Mix	9,9% [v/v]	5% [v/v]
Tris-HCl	375mM (pH 8,8)	127mM (pH 6,8)
SDS („sodium dodecyl sulfate“)	0,1% [w/v]	0,1% [w/v]
Ammonium Persulfat (APS)	0,1% [v/v]	0,1% [v/v]
TEMED	0,04% [v/v]	0,1% [v/v]

Laufpuffer**(Gelelektrophorese)****Transferpuffer****(Blotten)****TBS (10x, pH 7,6)****TBST (1x)**

Glycin	387mM	Glycin	194mM	TrisHCl	200mM	TBS (10x)	10% [v/v]
TrisHCl	50mM	TrisHCl	25mM	NaCl	1,5M	Tween	0,1% [v/v]
SDS	0,2% [w/v]	Methanol	20%				

SignaldetektionslösungAB

Lösung A		Lösung B	
TrisHCl (pH8,0)	98,5mM	TrisHCl (pH8,0)	99,4mM
Koumarsäure	0,39mM	H ₂ O ₂	0,018% [v/v]
Luminol	2,46mM		

3.7.4 Immunhistochemie

Die Paraffinschnitte der murinen Wundheilungskinetiken wurden entparaffiniert und immunhistochemisch nach der ‚ABC Technik‘ gefärbt. Zunächst wurden die Epitope durch Aufkochen (600Watt in der Mikrowelle, 3x5 Minuten) der Paraffinschnitte in Zitratpuffer [10mM] aufgeschlossen. Anschließend wurde endogene Peroxidase mit 0,3% H_2O_2 in PBS für 20 Minuten bei Raumtemperatur blockiert. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS erfolgte die Blockierung des endogenen Biotins und des Zweitantikörper-Epitops. Hierfür wurde eine 30 minütige Inkubation in verdünntem Normalserum der Spezies, in welcher der Zweitantikörper generiert wurde (1:10 in 1x PBS mit 5% Milchpulver) und 4 Tropfen Avidin-Lösung (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) durchgeführt. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 1xPBS und eine Sättigung der Streptavidinbindungen durch eine Inkubation in 1x PBS mit 5% Milchpulver und 4 Tropfen Biotin-Lösung (Streptavidin/Biotin Blocking Kit, Vector Laboratories) für 15 Minuten bei Raumtemperatur. Die Inkubation der Erstantikörper erfolgt bei 4°C über Nacht (Konzentration siehe Punkt 3.3, Verdünnung in ChemMate Antibody Diluent S2022, DakoCytomation). Nach einer Behandlung mit Triton-PBS (0,05%) erfolgten zwei Waschschriffe mit 1xPBS. Anschließend wurde mit einem biotinylierten Zweitantikörper (Konzentration siehe Punkt 3.3, Verdünnung in 1xPBS mit 2,5% Milchpulver) für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Nach einem Waschschrift mit 1xPBS erfolgte die HRP-Konjugation des Zweitantikörpers durch Behandlung mit einem AB Komplex (30 Minuten bei Raumtemperatur, Vectastain® ABC Standard Kit, Vector Laboratories). Nach einem weiteren Waschschrift mit 1xPBS wurde die Signaldetektion durch eine Inkubation mit einer Peroxidase Substrat Lösung (2-10 Minuten, DAB substrate Kit, Vector Laboratories) durchgeführt. Die Farbreaktion wurde mit Leitungswasser gestoppt. Die Kerngegenfärbung erfolgte mit Hämalaun für 45 Sekunden und das Eindecken der Schnitte mit Gelatine.

Zitratpuffer [10mM], (pH 6)

Zitronensäure	1,8mM
triNa-Zitrat	8,2mM

Phosphate Buffered Saline (10x, pH 7,2)

NaCl	1,5M
Natriumphosphat	1M

3.8 Nukleinsäuren-Analytik

3.8.1 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Gesamt-RNA aus Zellen wurde mittels des NucleoSpin® RNA II Kit (Macherey-Nagel) nach Herstellerangaben isoliert und photometrisch quantifiziert (bei 260 nm und 280 nm, Ratio >1,8). Um die Qualität zu überprüfen, wurde 1 µg der Gesamt-RNA (1 µg Gesamt-RNA + 5 µl Probenpuffer ad 12 µl DEPC H₂O, 3-5 Minuten bei 65°C denaturieren) elektrophoretisch in einem 1%igen RNA Gel (0,24 g Agarose, 2 ml MOPS (10x), 18 ml DEPC H₂O, 600 µl 37%iges Formaldehyd, bei 100 V für 60 Minuten) aufgetrennt. Bei kurzer Lagerzeit wurde die Gesamt-RNA bei –20°C, längerfristig bei –70°C aufbewahrt.

MOPS (10x)

MOPS	200mM
Na-Acetat	50mM
EDTA	10mM
pH 7,0	

DEPC H₂O

Diethylpyrocarbonat	1% [v/v]
H ₂ O	99%
über Nacht rühren, autoklavieren	

RNA-Probenpuffer

MOPS (10x)	0,1% [v/v]
Formaldehyd	7,3% [v/v]
Formamid	67% [v/v]
Bromphenolblau	0,1% [w/v]
Ethidiumbromid	0,01% [w/v]

Laufpuffer (1xMOPS)

10x MOPS	10%
DEPC H ₂ O	90%

3.8.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Die Gesamt-RNA wurde durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Dazu wurden Randomprimer [200 ng], Gesamt-RNA (,template‘) [1 µg] und NTPs [je 0,8mM] auf 15 µl mit H₂O aufgefüllt und für 5 Minuten bei 70°C inkubiert. Nach Zugabe von 4 µl Reaktionspuffer (5x) erfolgte eine Inkubation für 5 Minuten bei 25°C. Anschließend wurde Reverse Transkriptase (RevertAid™ H Minus MuLV) [200 U] hinzugefügt, worauf eine Inkubation von 10 Minuten bei 25°C, 60 Minuten bei 42°C erfolgte. Die Inaktivierung der reversen Transkriptase erfolgte bei 70°C für 10 Minuten.

3.8.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Um die Artspezifität der eingesetzten Primer durch PCR Analysen zu überprüfen, wurde cDNA als ‚*template*‘ eingesetzt, welche aus muriner Gesamt-RNA (wildtyp Fibroblasten) oder humaner Gesamt-RNA (HaCaT Zellen) gewonnen wurde (siehe Punkt 3.8.1). Die PCR Produkte wurden in einem 2%igen Agarosegel (2 g Agarose, 100 ml 1xTAE Puffer, 3 µl Ethidiumbromid) elektrophoretisch aufgetrennt (120 V, 45 Minuten) und anschließend digital dokumentiert.

PCR Mastermix

Puffer (10x)	10% [v/v]
MgCl ₂	1,5mM
je dNTP	0,4mM
Taq Polymerase	0,625 U/25 µl
je Primer	0,6µM
cDNA (‚ <i>template</i> ‘)	1:10 (Zielgene)
	1:100 (endogene Kontrolle)

PCR Programm

50°C 2 min
95°C 15 min
95°C 15 sec
60°C 1 min

} 40x

TAE (50x)

TrisHCl	2M
Eisessig	0,0571% [v/v]
EDTA (pH 8,0)	50mM

Probenpuffer (10x)

Bromphenolblau	0,42% [w/v]
Xylen Cyanol FF	0,42% [w/v]
Glycerin	55,4% [v/v]

Laufpuffer (1xTAE)

TAE (50x)	0,02% [v/v]
H ₂ O	99,98%

3.8.4 Semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR

Die semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR Analysen wurden mit dem Absolute™QPCR SYBR® Green Fluorescein Mix (Abgene, Epsom, UK) durchgeführt, um die Expression verschiedener Gene unter definierten Bedingungen (Zytokinbehandlung/Wundheilungskinetik) zu quantifizieren. Dafür wurden die Expressionsdaten eines Gens und parallel dazu die eines sogenannten ‚*housekeeping genes*‘ als endogene Kontrolle (hier: GAPDH bei allen humanen und beta Tubulin bei allen murinen ‚*templates*‘) jeweils unter allen definierten Bedingungen als Dreifachbestimmung (Triplett) erhoben. Dabei wurden nur Primerpaare eingesetzt, bei denen in der Schmelzkurvenanalyse keine unspezifischen Produkte oder Primerdimere auftraten. Anschließend wurde für jedes Gen (Primerpaar) anhand einer logarithmischen Verdünnungsreihe (1:10, 1:100, 1:1.000, 1:10.000) eine Standardkurve mit Korrelationskoeffizienten generiert (siehe Punkt 3.4).

Anhand der Gleichung der entsprechenden Standardkurve wurden jeweils die Mittelwerte (MW) und die Standardabweichungen (STABW) der Triplett-ct-Werte in durchschnittliche

relative Mengeneinheiten (^{MW}Gen bzw. $^{MW}\text{endogK}$ und $^{STABW}\text{Gen}$ bzw. $^{STABW}\text{endogK}$) umgerechnet. Die durchschnittliche relative Mengeneinheit einer Genexpression wurde gegen die entsprechende durchschnittliche relative Mengeneinheit der endogenen Kontrolle normalisiert (a). Anschließend wurde die relative mRNA-Expression eines Gens unter den definierten Bedingungen im Vergleich zu den Expressionsdaten unter der Kontrollbedingung (Referenzwert: $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten, unbehandelte HaCaT Zellen oder unverwundete murine Haut) ermittelt (b). Die Fortpflanzung der Standardabweichung wurde jeweils entsprechend gültiger statistischer Verfahren errechnet (Ewens et al., 2001).

- b) Normalisierte, durchschnittliche, relative Mengeneinheit der mRNA-Expression eines Gens unter einer bestimmten Bedingung (X):

$$\text{normalisierte } ^{MW}\text{Gen}_X = \frac{^{MW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{endogK}_X}$$

Standardabweichung der normalisierten, durchschnittlichen, relativen Mengeneinheit:

$$\text{STABW} = \sqrt{\left(\frac{^{STABW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{Gen}_X}\right)^2 + \left(\frac{^{STABW}\text{endogK}_X}{^{MW}\text{endogK}_X}\right)^2} \times \frac{^{MW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{endogK}_X}$$

- c) Relativer mRNA-Expressionswert eines Gens unter einer bestimmten Bedingung (X) gegen den Referenzwert unter der Kontrollbedingung (R) abgeglichen:

$$\text{rel. mRNA Expression}_X = \frac{^{MW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{endogK}_X} \times \frac{^{MW}\text{endogK}_R}{^{MW}\text{Gen}_R}$$

Standardabweichung des relativen mRNA-Expressionswertes:

$$\text{STABW} = \sqrt{\left(\frac{^{STABW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{Gen}_X}\right)^2 + \left(\frac{^{STABW}\text{endogK}_X}{^{MW}\text{endogK}_X}\right)^2} \times \frac{^{MW}\text{Gen}_X}{^{MW}\text{endogK}_X} \times \frac{^{MW}\text{Gen}_R}{^{MW}\text{Gen}_X}$$

Pipettierschema (25µl Ansatz)		qPCR Programm	Schmelzkurven-analyse
Mastermix (2x)	50% [v/v]	50°C 2 min	95°C 15 sec
je Primer	300nM	95°C 15 min	60°C 30 sec
cDNA (<i>,template‘</i>)*	$\frac{1}{5}$ des Ansatzes	95°C 15 sec	95°C 15 sec
- Zielgene	1:10	60°C 1 min } 40x	
- endogene Kontrollen	1:100		

*Die cDNA wurde für die Amplifikation von Zielgenen 1:25 (Endkonzentration 1:10) und für die Amplifikation der endogenen Kontrollen 1:1.000 (Endkonzentration 1:100) verdünnt, um systematische Pipettierfehler und Ungenauigkeiten zu minimieren.

3.8.5 *,GeneChip® Expression Arrays‘*

3.8.5.1 Generierung der Arraydaten

Die *,GeneChip® Expression Arrays‘* wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Schultze (Uniklinikum Köln, Innere Medizin I) durchgeführt. Hierzu wurden die Gesamt-RNA Isolate von den zytokinbehandelten Kokulturrexperimenten unter Angliederung eines Linker-Oligonukleotides (T7-RNA-Polymerase Promotor) am 5‘ Ende in cDNA revers transkribiert (Methode beschrieben in Husson et al., 2002). Anschließend erfolgte eine *in vitro* Transkription, wobei die cRNA mit biotinyliertem UTP markiert wurde. Die markierten cRNA Proben wurden fragmentiert und zur ausschließlichen Hybridisierung auf je einen *,Human Genome U133A 2.0 Array‘* (Affymetrix) aufgetragen.

Ein *,Human Genome U133A 2.0 Array‘* umfaßt über 14.500 Gene des humanen Genoms, wobei von jedem Gen 11-20 Oligonukleotidabschnitte mit einer Länge von 25 bp vorhanden sind (= 1 Probensatz). Einige Gene, wie beispielsweise uPAR und TNFAIP3 sind aufgrund der Zuordnung von zwei *,gene bank accession‘* Nummer mit entsprechend zwei Probensätze auf dem Array vertreten, so daß ein *,Human Genome U133A 2.0 Array‘* insgesamt über 22.000 Probensätze beinhaltet. Die einzelnen Oligonukleotidabschnitte (Proben) liegen als Paare einmal mit der wildtyp Sequenz (*,perfect match‘*) und einmal mit einer mutierten Sequenz (*,mismatch‘*) zur Detektion unspezifischer Hybridisierungen jeweils in zahlreichen Kopien vor.

Im Anschluß an die Hybridisierung wurde die Signalintensität nach Reaktion mit einem Streptavidin-Phycoerythrin-Chromogen gemessen, mit der *,Affymetrix® Microarray Suite Software‘* verwaltet und mit *,dchip1.3‘* ausgewertet. Dabei läßt die gemessene Signalintensität

(Array-Rohdaten) einen Rückschluß auf die Anzahl der Hybridisierungsereignisse und damit auf die Quantität der ermittelten Transkripte zu.

3.8.5.2 Bioinformatische Auswertung

Um die Expressionsmuster der Keratinozyten bei unterschiedlichen Kulturbedingungen anhand der Array-Rohdaten vergleichen zu können, mußte bei der ‚*dchip1.3*‘ Analyse die Helligkeit der einzelnen ‚*GeneChip*[®] *Expression Arrays*‘ angeglichen werden (Normalisierung; Schadt et al., 2000). Anschließend wurden Gene aus der Auswertung ausgeschlossen, deren Signalintensität unterhalb der Nachweisgrenze lag, gesättigt war, oder deren Probensatz unspezifische Kreuzreaktionen aufwiesen (‚*PM-only-Model-based expression value*‘, Li et al., 2001 und 2003). Weiterhin wurden die Gene identifiziert, deren Signal sich nicht deutlich genug vom Hintergrund abhob (P call >20%, Li et al., 2003). Die Ergebnisse der ‚*PM-only-Model-based expression value*‘ Analysen sind in der folgenden Tabelle zusammengefaßt:

Array	Mittlere Helligkeit des Arrays	Prozent der ausgeschlos- senen Probensätze im jeweiligen Array	Prozent der ausgeschlos- senen Probenpaare im jeweiligen Array	Prozent der Probensätze im Array, deren Färbungsintensität 20% über dem Hin- tergrund lag
1a	107	0,076	0,042	47,4
2a	120	0,049	0,048	52,6
3a	115	0,036	0,032	52,7
4a	132	0,054	0,041	50,5
5a	127	0,009	0,026	53,2
1b	123	0,018	0,03	52,3
2b	106	0,081	0,073	50,9
3b	126	0,054	0,041	53,2
4b	122	0,058	0,026	51,5
5b	151	0,009	0,02	51,0

Der Vergleich der Array-Rohdaten zwischen den unterschiedlichen Arrays erfolgte mit der Auswertungssoftware ‚*dchip1.3*‘ (‚*compare samples*‘). Für die Vergleichswerte eines Gens (relative mRNA-Expressionsänderung) wurden die Array-Rohdaten auf die Daten einer Referenz (^{c-jun}-/- Keratinozyten) bezogen. Der Schwellenwert für eine aussagekräftige Expressionsänderung ist bei einer $\pm 1,3$ fachen Regulation festgelegt worden. Um den Einfluß von Meßungenauigkeiten auf die relativen mRNA-Expressionswerte zu minimieren, wurden dabei alle potentiellen Zielgene mit einer zu geringen absoluten Differenz der Array-Rohdaten ($\geq +100$ oder ≤ -100) aus der Analyse ausgeschlossen (Li et al., 2003).

So wurden alle Gene von Keratinozyten, die unter einer bestimmten Kokulturbedingung kultiviert wurden (^xKeratinozyten, Array-Rohdaten von ^xKeratinozyten = ArD ^xK), identifiziert,

deren mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression von $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten (Array-Rohdaten von $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten = $\text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K}$) um mindestens einen Faktor von $\pm 1,3$ verändert waren. Es gilt demnach:

$$\left| \frac{\text{ArD}^{\text{XK}}}{\text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K}} \right| \geq 1,3 \quad \cup \quad \left| \text{ArD}^{\text{XK}} - \text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K} \right| \geq 100$$

Dabei muß die relative mRNA-Expressionsveränderung von mindestens $\pm 1,3$ entweder in beiden Versuchen (A und B), oder zumindest im Mittelwert aus den relativen mRNA-Expressionswerten beider Versuche gegeben sein.

Es gilt demnach:

$$\left| \frac{\text{ArD}^{\text{XK Versuch A}}}{\text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K Versuch A}} + \frac{\text{ArD}^{\text{XK Versuch B}}}{\text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K Versuch B}} \right| / 2 \geq 1,3 \quad \cup$$

$$\left| \text{ArD}^{\text{XK Versuch A}} - \text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K Versuch A} \right| \geq 100 \quad \cup$$

$$\left| \text{ArD}^{\text{XK Versuch B}} - \text{ArD}^{c\text{-jun}^{-/-}}\text{K Versuch B} \right| \geq 100$$

Aufgrund der Varianz zwischen den Versuchen A und B (siehe Punkt 5.3.1) basiert die Bildung des Mittelwertes auf den relativen mRNA-Expressionswerten und nicht auf den Array-Rohdaten. Die Array-Rohdaten der Gene, welche mit mehreren Probensätzen auf einem Array vertreten sind, konnten aufgrund der begrenzten Möglichkeit des Auswertungsprogramms nicht vor der Vergleichsanalyse gemittelt werden, so daß der Durchschnitt ebenfalls anhand der relativen Vergleichswerte errechnet wurde.

4 Ergebnisse

4.1 Die Expression von MET und HGF im Verlauf der kutanen Wundheilung

Die Expression des MET-Rezeptors in Keratinozyten und die Bioverfügbarkeit von HGF sind Voraussetzungen für die direkte Wirkung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems auf die epidermale Wundheilung. Da Daten bezüglich der Expression von MET und HGF im Verlauf der Wundheilung differieren (Cowin et al., 2001, Yoshida et al., 2003), wurde dieser Sachverhalt immunhistochemisch bzw. durch semiquantitative *realtime* PCR überprüft.

4.1.1 Die MET-Expression in der kutanen Wundheilung

Zur Analyse der Proteinbiosynthese und Lokalisation des HGF-Rezeptors während der Wundheilung wurden immunhistochemische Färbungen mit einem Antikörper gegen MET an Paraffinschnitten durchgeführt. Dabei wurde sowohl unverletzte als auch verwundete Haut am vierten, sechsten und achten Tag des Wundheilungsprozesses untersucht.

In der unverletzten Haut konnte eine fokale Proteinexpression des Rezeptors im Stratum basale belegt werden, die zytoplasmatisch teilweise granulär verdichtet auftrat (Abb. 6A). Am vierten Tag der Wundheilung wurde MET in den Keratinozyten der *migration-tongue* flächendeckend exprimiert (Abb. 6B und C). Diese Expression ließ sich auch noch am sechsten Tag nach Verwundung nachweisen (Abb. 6E). Ein Großteil der hyperplastischen Keratinozyten des Wundrandes exprimierten MET ebenfalls am vierten und auch am 16. Tag des Wundheilungsprozesses (Abb. 6D, E und F). Dabei war der Rezeptor zumeist in den vitalen Keratinozyten des Stratum basale und in den keratinisierenden Keratinozyten des Stratum granulosum und corneum nicht nachweisbar. Eine solche graduelle MET-Expression trat auch in der geschlossenen Wunde innerhalb der neu gebildeten Epidermis auf (achter Tag der Wundheilung, Abb. 6G-I).

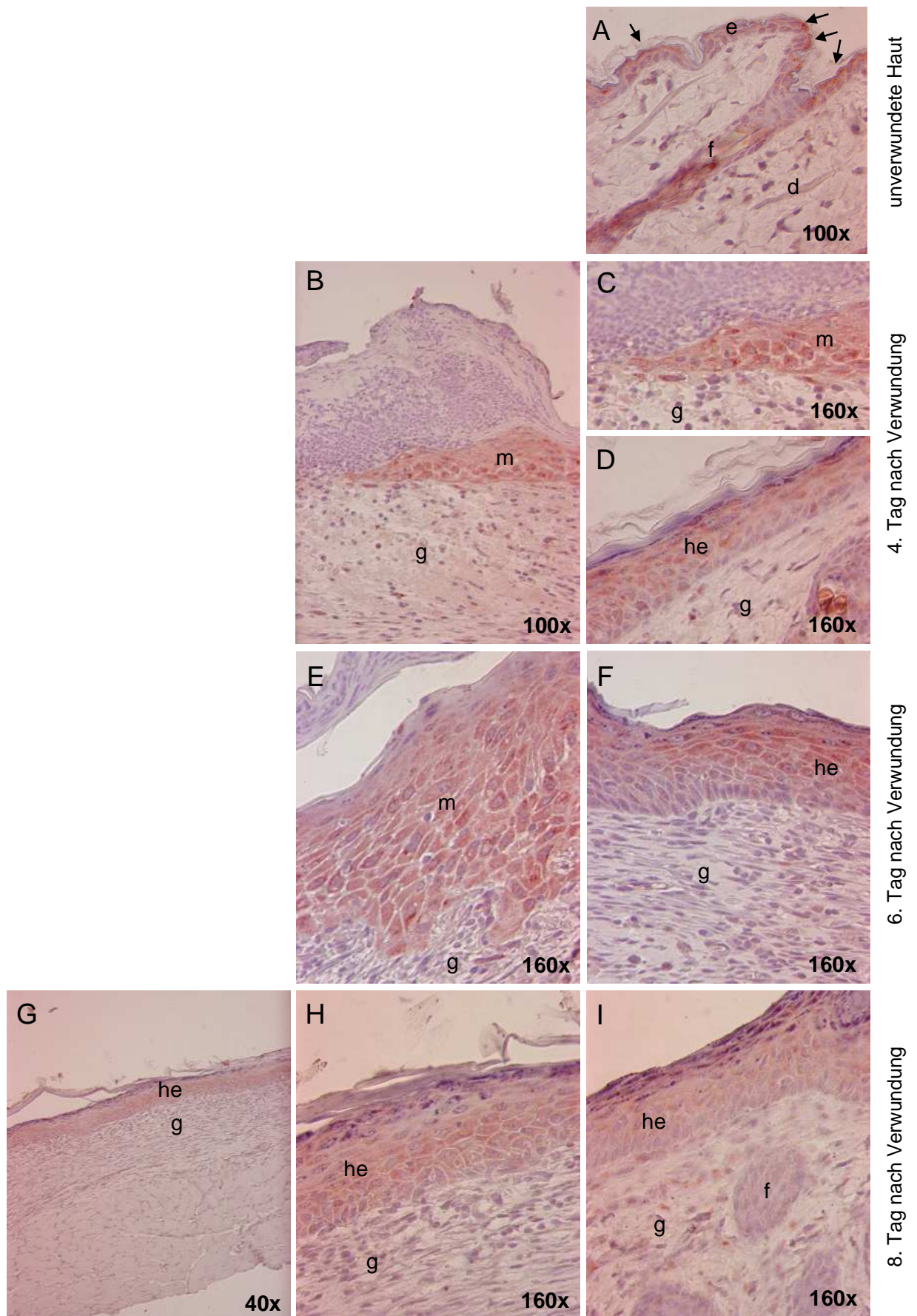


Abbildung 6: Expression des MET-Rezeptors in unverwundeter und verwundeter muriner Haut

Immunhistologische Färbung muriner Wunden mit anti-MET-Antikörper (rotbraune Farbreaktion durch DAB Peroxidase Substratlösung) zur Lokalisation der MET-Expression im Verlauf der Wundheilung. In unverwundeter Haut (A) wurde MET in basalen Keratinozyten exprimiert. Am vierten Tag der Wundheilung (B-D) lag eine ausgeprägte MET-Expression im Bereich der ‚migration tongue‘ (B,C) und vor allem in den peripheren Keratinozyten im Wundrand (D) vor. Sechs Tage nach der Wundsetzung wurde MET im Wundzentrum (E) und vor allem in den peripheren Keratinozyten des Wundrandes (F) exprimiert. Am achten Tag der Wundheilung (G-I) war die Expression von MET innerhalb des hyperplastischen, geschlossenen Wundbereich (G) auf die suprabasalen Keratinozyten des Wundzentrums (H) und des Wundrandes (I) beschränkt.

d = Dermis

e = Epidermis

g = Granulationsgewebe

f = Haarfollikel

he = hyperplastische Epidermis

m = ‚migration tongue‘

—► fokale Expression von MET

4.1.2 Die HGF-Expression in der kutanen Wundheilung

Die HGF-Speicherkapazität der extrazellulären Matrix bedingt eine diffuse Verteilung des Zytokins, wodurch immunhistochemisch keine eindeutige Aussage bezüglich der zellulären Quellen der HGF-Proteinbiosynthese im Wundheilungsverlauf getroffen werden kann (Abb. 7A). Dagegen läßt sich die HGF-mRNA-Synthese im Verlauf der Wundheilung eindeutig durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR nachweisen. Deshalb wurde zur Bestätigung und Quantifizierung der HGF-mRNA-Expression die Gesamt-RNA von unverletzter Haut und von murinen Wunden nach sechs und 24 Stunden sowie nach zwei, fünf und sieben Tagen in der qPCR analysiert. Die relative mRNA-Synthese wurde dabei durch einen Abgleich der Meßwerte in Bezug auf die unverwundete Haut errechnet. Die Expressionsdaten belegen, daß die HGF-mRNA-Expression während der Wundheilung im Vergleich zu unverwundeter Haut stark ansteigt (Abb. 7B). Bereits sechs Stunden nach Verwundung war der Transkript-Status von HGF um das Neunfache erhöht und erreichte nach 24 Stunden das 300fache des Ausgangswertes. Das mRNA-Synthesemaximum innerhalb des hier analysierten Zeitfensters wurde am zweiten Tag nach Wundsetzung mit einer Steigerung um den Faktor 2.500 erreicht. Fünf Tage nach Verletzung war die mRNA-Expression von HGF wieder ungefähr auf eine 1.100fache Induktion reduziert und stieg am siebten Tag nach Verwundung wieder leicht zu einer 1.700fachen Induktion an.

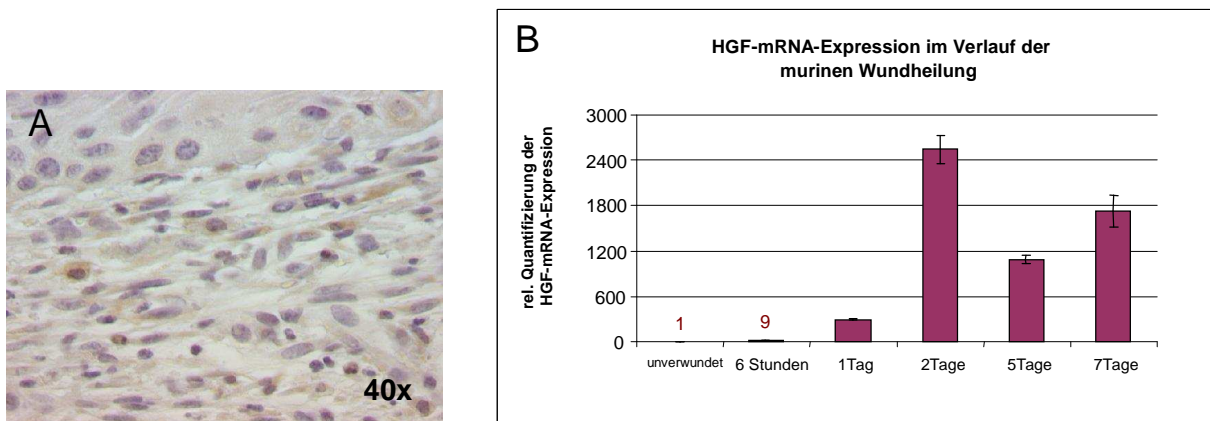


Abbildung 7: Nachweis von HGF in unverwundeter und verwundeter muriner Haut

Die Proteinexpression von HGF wurde exemplarisch am vierten Tag nach Verwundung immunhistochemisch nachgewiesen (A). Die relative mRNA-Expression von HGF wurde in unverwundeter Haut, sowie sechs Stunden, einen Tag, zwei Tage und fünf Tage nach Verletzung durch semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR analysiert (B). Dabei dienten die Meßwerte der HGF-mRNA-Synthese in unverwundeter Haut als Referenz.

4.2 Etablierung der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur als Wundheilungsmodell

Da die epidermale Expression von MET und die Zunahme der HGF-Expression während der murinen Wundheilung bestätigt werden konnte, ist eine direkte Auswirkung von HGF auf die Koordination der epidermalen Wundheilung möglich. Um die spezifischen Einflüsse von HGF auf das Expressionsmuster der Keratinozyten von redundanten Effekten anderer Zytokine abgrenzen zu können (Abb. 8), wurden Stimulierungsversuche mit verschiedenen Wachstumsfaktoren durchgeführt. Dabei wird in dieser Arbeit zwischen *Expressionsmuster* und *Expressionsprofil* unterschieden. Als *Expressionsmuster* wird hier die gesamte Expression aller Gene von Keratinozyten unter einer bestimmten Kulturbedingung verstanden. Dagegen wird mit *Expressionsprofil* die veränderte Expression eines bestimmten Gens in Keratinozyten in Abhängigkeit von unterschiedlichen Kulturbedingungen bezeichnet.

In den Stimulierungsversuchen wurden Keratinozyten nicht nur mit HGF, sondern auch mit den Wachstumsfaktoren KGF und GM-CSF behandelt, deren Expressions-modulierende Wirkungen auf Keratinozyten in der kutanen Wundheilung bereits beschrieben wurden (Tab. 1; vgl. Einleitung). Während KGF primär die Proliferation von Keratinozyten stimuliert, fördert GM-CSF zusätzlich auch die Differenzierungsprozesse dieser Zellen (Szabowski et al. 2000). Durch den Vergleich der Wirkungsspektren von HGF, KGF und GM-CSF können sowohl die spezifischen als auch die überlappenden Effekte dieser Zytokine identifiziert werden (differentieller Ansatz).

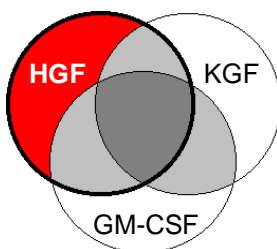


Abbildung 8: Schematische Darstellung des differentiellen Ansatzes zur Analyse der spezifischen und gemeinsamen Effekte von HGF, KGF und GM-CSF auf das Expressionsmuster von Keratinozyten

4.2.1 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von HGF, KGF und GM-CSF in $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten

Die Stimulierungsversuche wurden in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur aus primären humanen Keratinozyten und murinen wildtyp bzw. $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten durchgeführt. Um die Auswirkungen einer exogenen HGF-Stimulierung auf die primären Keratinozyten in vollem Umfang erfassen zu können, muß der Einfluß von endogenem HGF ausgeschlossen werden. Im Gegensatz zu KGF und GM-CSF (Szabowski et al. 2000, Angel et al. 2001 und 2002) ist die Reduktion der HGF-Expression in $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten jedoch noch nicht beschrieben. Aus diesem Grund wurde der Einfluß des $c\text{-jun}^{-/-}$ ‚knockout‘ in den Fibroblasten auf die mRNA-Expression von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF untersucht. Dafür wurde unter Verwendung von spezifischen Primern für HGF, KGF, GM-CSF und beta Tubulin (interne Referenz) die mRNA-Expression dieser Zytokine in murinen wildtyp und $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten semiquantitativ durch ‚realtime‘ PCR bestimmt. Somit wurde belegt, daß in $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten die mRNA-Expression von HGF analog zu der von KGF und GM-CSF um mehr als 99 Prozent reduziert vorlag (Abb. 9). Infolgedessen ist die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur zur Untersuchung der HGF spezifischen Effekte auf Keratinozyten im differentiellen Ansatz geeignet (Abb. 8).

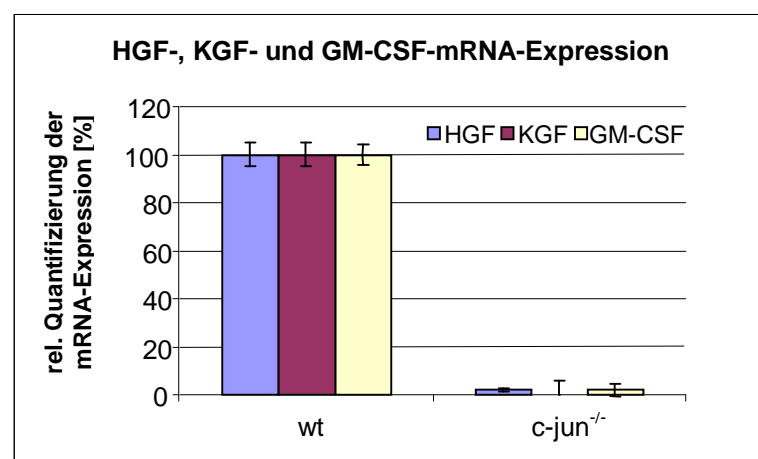


Abbildung 9: Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von HGF, KGF und GM-CSF in wildtyp und $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR
Als Referenz dienten jeweils die Meßwerte der mRNA-Synthese in den wildtyp Fibroblasten (wt).

4.2.2 Auswirkungen von HGF, KGF und GM-CSF auf primäre Keratinozyten in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur

Die Wirksamkeit der HGF-, KGF- und GM-CSF-Stimulierungen von primären Keratinozyten in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur wurde anhand morphologischer Kriterien untersucht. Dazu wurden primäre humane Keratinozyten in Kokultur mit murinen $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten mit diesen Zytokinen stimuliert (Tab. 2). Im Folgenden werden die unter diesen Kulturbedingungen behandelten Keratinozyten mit HGF^{K} Keratinozyten, bzw. mit KGF^{K} Keratinozyten, oder mit GM-CSF^{K} Keratinozyten abgekürzt. Als Kontrolle wurden unbehandelte primäre humane Keratinozyten sowohl mit murinen $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten als auch mit wildtyp Fibroblasten kokultiviert (Tab. 2). Diese Keratinozyten werden im Folgenden als $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten bzw. als wt^{K} Keratinozyten bezeichnet.

Tabelle 2: Versuchsaufbau zur differentiellen Analyse von HGF, KGF und GM-CSF in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur

Variation der Versuchsparameter	Kontrollen		Zytokinbehandlung		
Genotyp der Fibroblasten	wt	$c\text{-jun}^{-/-}$	$c\text{-jun}^{-/-}$	$c\text{-jun}^{-/-}$	$c\text{-jun}^{-/-}$
Zytokin [10 ng/ml]	-	-	HGF	KGF	GM-CSF
Abkürzung für entsprechend kultivierte Keratinozyten	wt^{K} Kera- tinozyten	$c\text{-jun}^{-/-}$ Kera- tinozyten	HGF^{K} Kera- tinozyten	KGF^{K} Kera- tinozyten	GM-CSF^{K} Kera- tinozyten

Die unterschiedlichen Kulturbedingungen zeigten fünf Tage nach Zytokinstimulierung deutliche Auswirkungen auf die Größe, den Differenzierungsgrad und die Form der Keratinozyten-Kolonien (Abb. 10). Unbehandelte primäre Keratinozyten in Kokultur mit wildtyp Fibroblasten bildeten gleichmäßig runde Kolonien (Abb. 10A und B). Diese Kolonien wiesen differenzierte, keratinisierte Zellen im Kern und undifferenzierte, vitale Zellen in der Peripherie auf (Abb. 10A und B). Dagegen war der Differenzierungsgrad der $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten auch im Randbereich überwiegend hoch (Abb. 10C, D und E) und der Anteil an teilungsfähigen Zellen und folglich auch die Koloniegröße im Vergleich wt^{K} Keratinozyten stark reduziert.

Bei Stimulierung mit allen drei Zytokinen nahm die Koloniegröße und die Anzahl undifferenzierter Keratinozyten im Vergleich zu den Kolonien der $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten deutlich zu (Abb. 10F-N), wobei wieder die Größe der wt^{K} Keratinozyten-Kolonien erreicht wurde (Rettung des

c-jun^{-/-} Phänotyps in Bezug auf die Morphologie). Im Gegensatz zu den runden Kolonien der unbehandelten Keratinozyten bildeten die zytokinbehandelten Keratinozyten-Kolonien asymmetrische Fortsätze aus. Dabei hing der Symmetriegrad der Kolonienränder vom eingesetzten Zytokin ab. Durch die Behandlung mit KGF bildeten sich runde Keratinozyten-Kolonien mit leichten Ausstülpungen (Abb.10 I-K). Dabei waren diese leicht asymmetrischen Kolonien durch mehrere Differenzierungsherde gekennzeichnet. Die Asymmetrie der Kolonienränder nahm bei GM-CSF-Einwirkung zu (Abb. 10F-H) und ist unter HGF-Behandlung am höchsten (Abb. 10L-N).

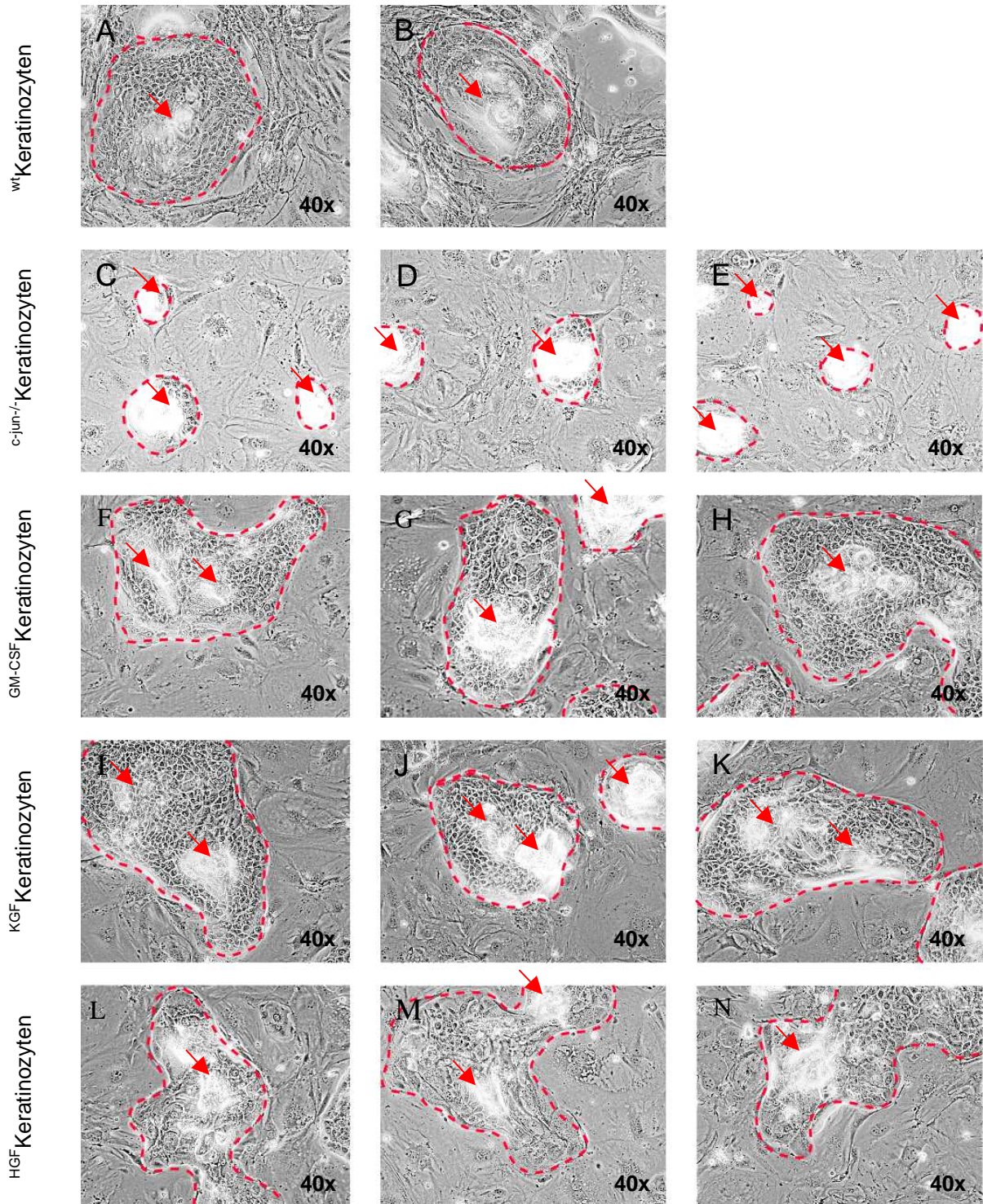


Abbildung 10: Morphologische Charakteristika primärer Keratinozyten-Kolonien in der heterologen 'feeder-layer' Kokultur nach Behandlung mit HGF, KGF oder GM-CSF

Die ^{wt}Keratinozyten bildeten gleichmäßig runde Kolonien mit vitalen Zellen in der Peripherie (A, B). Die Kolonien der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten waren kleiner und bestanden hauptsächlich aus differenzierten Zellen (C, D, E). Bei Zytokinbehandlung nahm der Anteil an vitalen Zellen sowie die Größe der Keratinozyten-Kolonien wieder zu, wobei die Kolonienränder der ^{KGF}Keratinozyten (I, J, K) rund und die der ^{GM-CSF}Keratinozyten (F, G, H) und der ^{HGF}Keratinozyten (L, M, N) zunehmend asymmetrisch waren.

..... Umriß der Keratinozyten-Kolonien

→ Region differenzierter Keratinozyten

4.2.3 Bestimmung des Zeitpunkts maßgeblicher Veränderungen der mRNA-Expression durch HGF, KGF und GM-CSF

Um den Zeitpunkt der maßgeblichen Effekte von Zytokinen auf die mRNA-Synthese in Keratinozyten zu identifizieren, wurden die Expressionsprofile bekannter Zielgene von HGF (VEGF, Gille et al. 1998), KGF (VEGF und MMP10, Koyama et al. 2002, Madlener et al. 1996) und GM-CSF (IL-18, Informationen von Dr. Szabowski, DKFZ Heidelberg) in der semiquantitativen *realtime* PCR untersucht. Die analysierte Gesamt-RNA stammte jedoch nicht nur aus primären Keratinozyten, sondern auch aus kokultivierten murinen Fibroblasten. Um die mRNA-Expressionsanalysen ausschließlich auf die humanen Keratinozyten zu beziehen, wurden sowohl für die Zielgene als auch für die interne Referenz (GAPDH) humanspezifische Primer eingesetzt. Die Spezifität der Primer wurde mittels PCR überprüft (Abb.11A-D). Dabei wurde humane cDNA sowohl mit den Primern für VEGF, MMP10, IL-18 als auch für GAPDH gezielt amplifiziert. Dagegen konnte unter Verwendung eines murinen *templates* mit diesen Primern kein PCR-Produkt nachgewiesen werden.

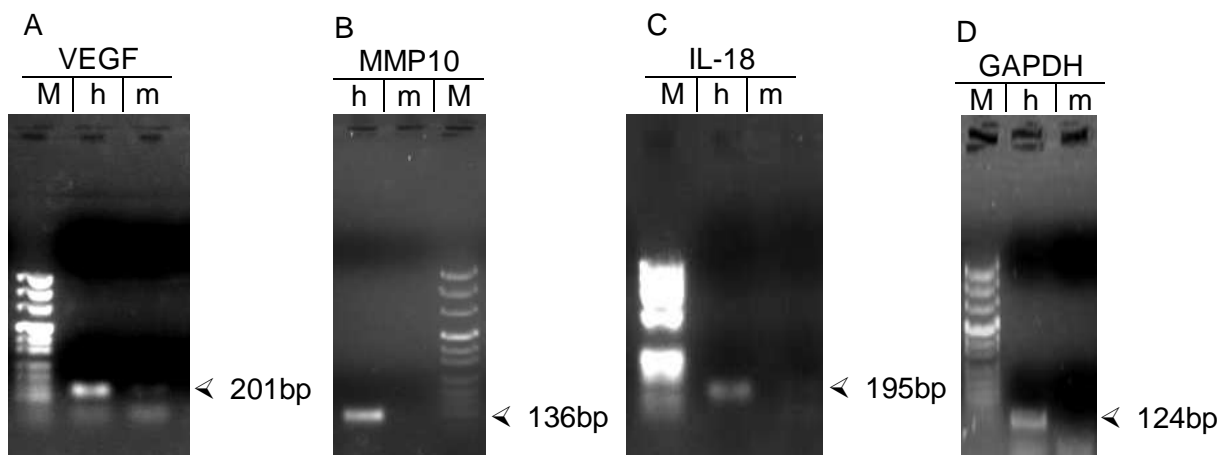


Abbildung 11: Nachweis der Artspezifität von Primern mittels PCR Analyse

In der PCR konnte mit den Primern für VEGF (A), MMP10 (B), IL-18 (C) und GAPDH (D) nur von humaner cDNA, aber nicht von muriner cDNA ein spezifisches Produkt amplifiziert werden.

M = pUC Mix Marker 8 (MBI Fermentas)

h = humanes *template* (cDNA aus HaCaT Zellen)

m = murines *template* (cDNA aus murinen wildtyp Fibroblasten)

Im Anschluß an den Nachweis der Primer-Artspezifität konnten die mRNA-Expressionsprofile von VEGF, MMP10 und IL-18 in primären Keratinozyten untersucht werden. Dafür wurden humane Keratinozyten in Kokultur mit $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten für drei und sechs Stunden mit je einem der drei Wachstumsfaktoren nach den definierten Bedingungen behandelt (Tab. 2, Abb. 10). Als Kontrollen dienten sowohl wt Keratinozyten als auch $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten. Diese Stimulierungsversuche wurden in zwei unabhängigen Experimenten durchgeführt (Vorversuch A und B), da die heterologe *feeder-layer* Kokultur für kleinste Varianzen in der Handhabung (zum Beispiel bei Trypsinierung der Zellen oder Bestrahlung der Fibroblasten) äußerst anfällig ist. Anschließend wurden die mRNA-Expressionsprofile der Zielgene durch semiquantitative *realtime* PCR ermittelt. Für die Bestimmung der relativen mRNA-Expressionswerte wurden die qPCR-Meßwerte der Keratinozyten unter verschiedenen Kokulturbedingungen jeweils auf die Werte der $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten (Referenzwerte) bezogen.

Die auf diese Weise ermittelten relativen mRNA-Expressionswerte fielen in den Vorversuchen A und B bezüglich der Intensität unterschiedlich aus (Abb. 12). Dennoch stimmten in beiden Versuchen die Relationen der mRNA-Expressionsveränderungen aufgrund der verschiedenen Kokulturbedingungen überein. Daher konnten beide Vorversuche gemeinsam ausgewertet werden, indem ein Mittelwert aus den relativen mRNA-Expressionswerten von Vorversuch A und von Vorversuch B gebildet wurde.

Die mRNA-Synthese der Zielgene VEGF, MMP10 und IL-18 wurden nach drei- und sechsstündiger Behandlung mit den entsprechenden Zytokinen untereinander verglichen. Die mRNA-Expression in den $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten war in allen untersuchten Zielgenen am geringsten ausgeprägt (Abb. 12). Die mRNA-Synthese von VEGF wurde drei Stunden nach HGF-Behandlung (320 prozentige Induktion) stärker induziert als nach sechs Stunden (157 prozentige Induktion, Abb. 12A). Dabei überschritt die mRNA-Expression von VEGF drei Stunden nach HGF-Behandlung das mRNA-Expressionsniveau der wt Keratinozyten, welche unter konstitutiver, endogener Zytokinsekretion durch die wildtyp Fibroblasten wuchsen. Sechs Stunden nach HGF-Stimulierung lag der VEGF-Transkript-Level dagegen nur noch leicht über dem der wt Keratinozyten. Auch bei der Behandlung mit KGF wurde nach drei Stunden die höchste Induktion der VEGF-mRNA-Synthese mit 192 Prozent und der MMP10-mRNA-Synthese mit 116 Prozent erreicht (Abb. 12B und C). Sechs Stunden nach KGF-Behandlung lag die VEGF-mRNA-Expression leicht unter dem Expressionsniveau der wt Keratinozyten

(Abb. 12B). Die mRNA-Synthese von MMP10 glich sich nach sechsstündiger KGF-Behandlung etwa an die der ^{wt}Keratinozyten an (Abb. 12B). Dabei lag die MMP10-mRNA-Expression der ^{KGF}Keratinozyten und ^{wt}Keratinozyten nur unwesentlich höher als die der ^{c-jun/-}Keratinozyten. Im Gegensatz zu VEGF und MMP10 erreichte die IL-18-mRNA-Synthese erst sechs Stunden nach Behandlung mit GM-CSF das Transkript-Niveau der ^{wt}Keratinozyten mit einer Induktion von 190 Prozent (Abb. 12D). Die Induktion von IL-18 nach der dreistündigen GM-CSF-Stimulierung fiel geringer aus.

Somit wurde sowohl bei der HGF-bedingten Induktion von VEGF als auch bei der KGF-bedingten Induktion von VEGF und MMP10 die mRNA-Expression nach dreistündiger Zytokinbehandlung am stärksten induziert. Auf der Basis der Ergebnisse dieser Vorversuche wurden die Auswirkungen von HGF, KGF und GM-CSF auf die Expressionsmuster der Keratinozyten drei Stunden nach den Zytokinbehandlungen analysiert.

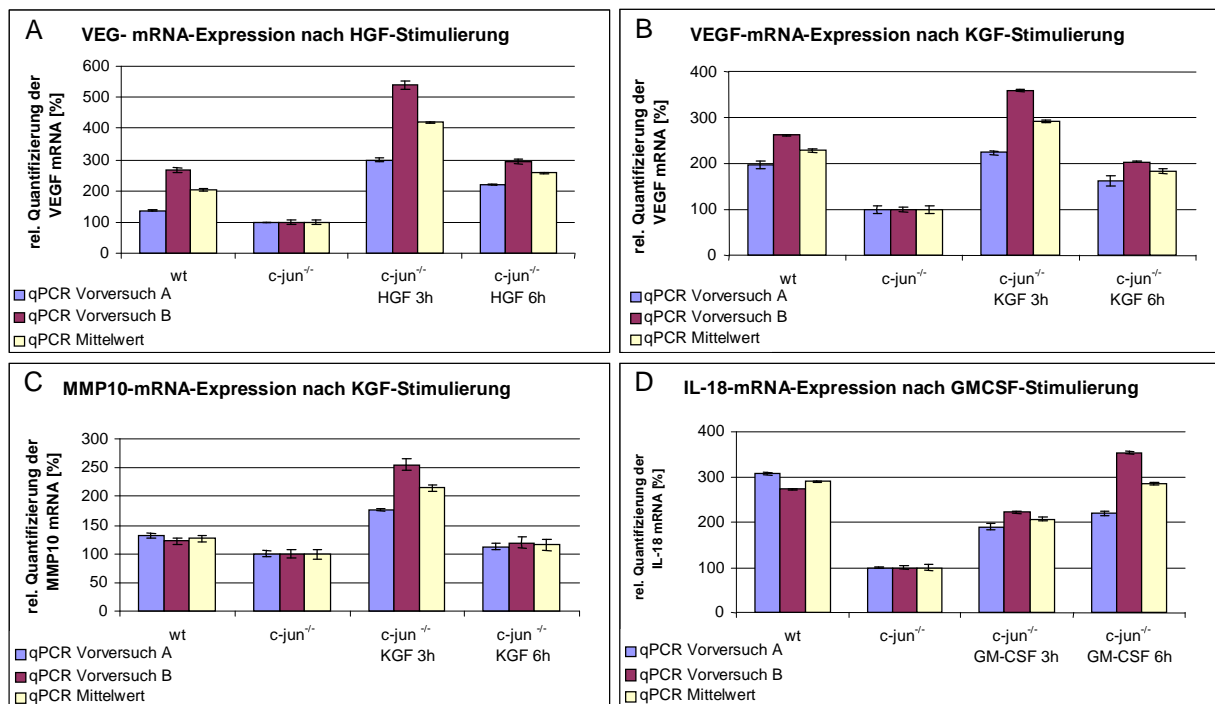


Abbildung 12: Relative Quantifizierung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene in primären Keratinozyten

Zur Bestimmung des Zeitpunktes, zu dem maßgebliche Genregulationen nach Zytokinbehandlung auftreten, wurden primären Keratinozyten in Kokultur mit c-jun^{-/-} Fibroblasten für drei und sechs Stunden mit HGF, KGF und GM-CSF [10 ng/ml] behandelt. Als Kontrollen wurden primäre Keratinozyten sowohl mit wildtyp Fibroblasten als auch mit c-jun^{-/-} Fibroblasten ohne Zugabe von Zytokinen kultiviert. Anschließend wurde die relative mRNA-Expression ausgewählter Zielgene in der semiquantitativen ‚realtime‘ PCR ermittelt. Dabei wurde das Expressionsprofil von VEGF sowohl nach HGF-Behandlung (A), als auch nach KGF-Behandlung (B), das Expressionsprofil von MMP10 nach KGF-Behandlung (C) und das Expressionsprofil von IL-18 nach GM-CSF-Behandlung (D) ausgewertet.

4.3 ‚GeneChip® Expression Array‘-Hybridisierung und bioinformatische Auswertung

4.3.1 ‚GeneChip® Expression Array‘-Hybridisierung

Nachdem die heterologe ‚feeder-layer‘ Kokultur aus Keratinozyten und wildtyp bzw. *c-jun*^{-/-} Fibroblasten in den Vorversuchen als geeignetes Wundheilungsmodell etabliert wurde, konnte die Auswirkung von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf das mRNA-Expressionsmuster von Keratinozyten mittels ‚GeneChip® Expression Arrays‘ (Affymetrix) analysiert werden. Dafür wurden nach dem ausgetesteten Protokoll der Vorversuche (dreistündige Behandlung mit HGF, KGF und GM-CSF [10 ng/ml], Kontrollen: ^{wt}Keratinozyten und *c-jun*^{-/-} Keratinozyten) erneute Stimulierungsversuche mit Keratinozyten in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur durchgeführt. Auch hier wurde eine Doppelbestimmung vorgenommen (Versuch A und Versuch B). Aus den einzelnen Kokulturansätzen wurde RNA isoliert und die Qualität sowohl photometrisch als auch in der Gelelektrophorese überprüft (Abb. 13). Anschließend wurde für beide Versuche pro Versuchsbedingung (unbehandelte Keratinozyten in Kokultur mit wildtyp bzw. *c-jun*^{-/-} Fibroblasten, sowie dreistündige HGF-, KGF- oder GM-CSF-Behandlung von Keratinozyten in Kokultur mit *c-jun*^{-/-} Fibroblasten) je eine Hybridisierung auf einem ‚Human Genome U133A 2.0 Array‘ in Kooperation mit Prof. Schultze (Universität zu Köln, Innere Medizin I) durchgeführt. Durch die Artspezifität der ‚Human Genome U133A 2.0 Arrays‘ konnten Hybridisierungen von kontaminierender, muriner cRNA aus den kokultivierten Fibroblasten weitgehend ausgeschlossen werden.

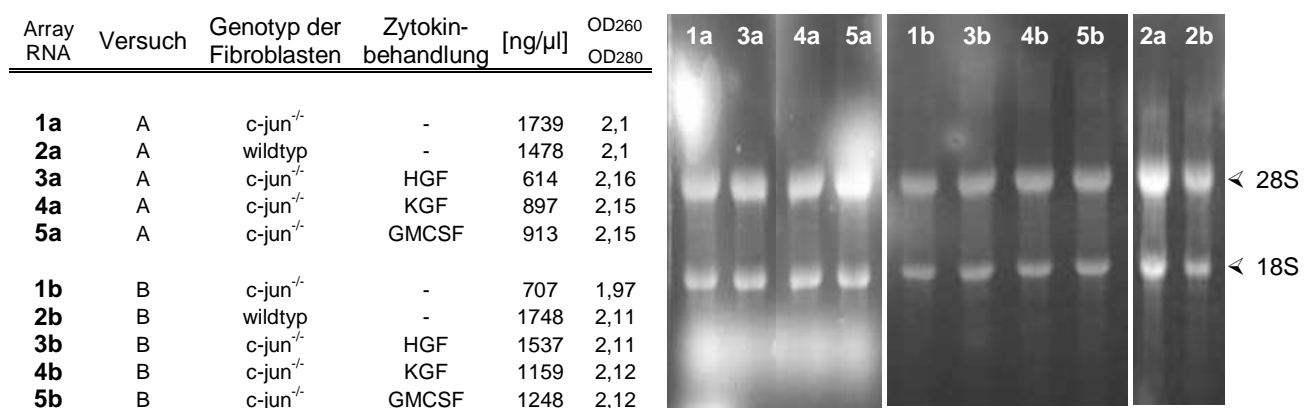


Abbildung 13: Photometrische Quantifizierung und Qualitätskontrolle der drei Stunden nach Zytokinbehandlung isolierten Gesamt-RNA auf einem 1%igem RNA Gel

Die Analyse der ‚GeneChip® Expression Array‘-Hybridisierung erfolgte mit der Auswertungssoftware ‚dchip1.3‘. Zunächst wurden die Array-Rohdaten durch ‚PM-only Model-based expression values‘ (Li et al., 2001 und 2003) bereinigt (siehe Kapitel 3.1.5.2). Über die Regulation dieser Gene, die aufgrund der Vorselektion aus der Auswertung herausgenommen wurden, kann keine Aussage getroffen werden. Anhand der restlichen, in allen Arrays gemeinsam auswertbaren Gene wurde anschließend der Einfluß der Zytokinbehandlungen auf die Keratinozyten analysiert.

4.3.2 Vergleichende Analyse der relativen mRNA-Expressionswerte auf Basis der ‚GeneChip® Expression Array‘-Daten













4.3.2.1 Identifikation der Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF

Zur Identifikation potentieller, zytokinspezifischer Zielgene wurden die Array-Rohdaten mit der Software ‚dchip1.3‘ verglichen. Um die relativen mRNA-Expressionswerte aller auswertbaren Gene auf den einzelnen Arrays zu ermitteln, wurde ein Quotient aus den Array-Rohdaten gebildet (Li et al., 2003). Dabei dienten die Rohdaten der $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten als Referenzwert (Tab. 3). Für die Identifikation potentieller Zielgene galt eine Regulation der mRNA-Expression ab einem Faktor von $\pm 1,3$ als aussagekräftig. Somit konnten im Versuch A insgesamt 270 potentielle Zielgene von HGF, 111 von KGF und 143 von GM-CSF ermittelt werden (Tab. 3A). In Versuch B wurden 118 mögliche Zielgene von HGF, 409 von KGF und 21 von GM-CSF gefunden (Tab. 3A), von denen jeweils 35 bzw. 19 und 3 zugleich in Versuch A auftraten (Tab. 3B). Insgesamt wurden damit in beiden Versuchsansätzen 353 verschiedene potentielle Zielgene von HGF, 506 von KGF und 161 von GM-CSF festgestellt (Tab. 3C).

Um Gene zu identifizieren, welche gemeinsam oder spezifisch durch die eingesetzten Zytokine reguliert wurden, wurden die jeweiligen Zielgene der drei Wachstumsfaktoren auf der Grundlage von logischen Verknüpfungen (‚UND‘, ‚ODER‘, ‚UND NICHT‘ und ‚ODER NICHT‘) miteinander verglichen. Überschneidungen von Zielgenen der drei Zytokine konnten ermittelt werden, indem Schnittmengen aus zwei Stimulationsversuchen (HGF mit KGF oder HGF mit GM-CSF), bzw. aus allen drei Stimulationsversuchen (HGF mit KGF und mit GM-CSF) erstellt wurden (Tab. 3D). So konnten 107 Gene von HGF^{HGF} Keratinozyten und KGF^{KGF} Keratinozyten identifiziert werden, deren mRNA-Expression im Vergleich zur mRNA-Expression von $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten um mehr als $\pm 1,3$ verändert war. Insgesamt 84 Gene wurden durch HGF und GM-CSF reguliert und 37 durch alle drei Zytokine gemeinsam. Außer-

dem wurde die spezifische Regulation von Genen durch HGF in Abgrenzung der KGF und/oder der GM-CSF regulierten Gene analysiert (Tab. 3E). So konnten 16 Gene von ^{HGF} Keratinozyten identifiziert werden, deren mRNA-Expression im Vergleich zu der von ^{c-jun/-} Keratinozyten um mindestens einen Faktor von $\pm 1,3$ verändert war, und deren mRNA-Expression in ^{KGF} Keratinozyten im Vergleich zur mRNA-Expression von ^{c-jun/-} Keratinozyten um weniger als $\pm 1,3$ verändert war. Weitere 28 Gene wurden nur durch HGF-, nicht aber durch GM-CSF-Behandlung reguliert und 13 Zielgene ausschließlich durch HGF- und weder durch KGF- noch durch GM-CSF-Behandlung. Die ausführlichen Tabellen dieser vergleichenden Analysen finden sich im Anhang.

Tabelle 3: Identifikation von gemeinsam oder spezifisch regulierten Zielgenen von HGF, KGF und GM-CSF

A	Ermittlung der relativen Expressionswerte von Zielgenen	mRNA- logisch verknüpfte Abfrage	Anzahl der Zielgene
	Zielgene von HGF (H) in Versuch A	1a/3a >+1,3 oder < -1,3	270
	Zielgene von KGF (K) in Versuch A	1a/4a >+1,3 oder < -1,3	111
	Zielgene von GM-CSF (G) in Versuch A	1a/5a >+1,3 oder < -1,3	143
	Zielgene von HGF (H) in Versuch B	1b/3b >+1,3 oder < -1,3	118
	Zielgene von KGF (K) in Versuch B	1b/4b >+1,3 oder < -1,3	409
	Zielgene von GM-CSF (G) in Versuch B	1b/5b >+1,3 oder < -1,3	21
B	Gemeinsame Zielgene eines Zytokins innerhalb der Doppelbestimmungen	logisch verknüpfte Abfrage	Anzahl der Zielgene
	Zielgene von HGF (H), die sowohl in Versuch A als auch in B aussagekräftig reguliert sind	(1a/3a und 1b/3b) >+1,3 und < -1,3	35
	Zielgene von KGF (K), die sowohl in Versuch A als auch in B aussagekräftig reguliert sind	(1a/4a und 1b/4b) >+1,3 und < -1,3	19
	Zielgene von GM-CSF (G), die sowohl in Versuch A als auch in B aussagekräftig reguliert sind	(1a/5a und 1b/5b) >+1,3 und < -1,3	3
C	Alle Zielgene eines Zytokins innerhalb der Doppelbestimmungen	logisch verknüpfte Abfrage	Anzahl der Zielgene
	Zielgene von HGF (H), die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind	(1a/3a oder 1b/3b) >+1,3 oder < -1,3	353
	Zielgene von KGF (K), die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind	(1a/4a oder 1b/4b) >+1,3 oder < -1,3	506
	Zielgene von GM-CSF (G), die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind	(1a/5a oder 1b/5b) >+1,3 oder < -1,3	161

Fortsetzung von Tabelle 3

D	gemeinsam regulierte Zielgene	logisch verknüpfte Abfrage	Anzahl der Zielgene
	Schnittmenge der HGF- und KGF- abhängig regulierten Zielgene	$[(3a/1a \text{ oder } 3b/1b) \text{ UND } (4a/1a \text{ oder } 4b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	107
	Schnittmenge der HGF- und GM-CSF- abhängig regulierten Zielgene	$[(3a/1a \text{ oder } 3b/1b) \text{ UND } (5a/1a \text{ oder } 5b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	84
	Schnittmenge der HGF-, KGF- und GM-CSF- abhängig regulierten Zielgene	$[(3a/1a \text{ oder } 3b/1b) \text{ UND } (4a/1a \text{ oder } 4b/1b) \text{ UND } (5a/1a \text{ oder } 5b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	37
E	spezifisch regulierte Zielgene	logisch verknüpfte Abfrage	Anzahl der Zielgene
	HGF- und nicht KGF-abhängig regulierte Zielgene	$[(3a/1a \text{ und } 3b/1b) \text{ UND NICHT } (4a/1a \text{ oder } 4b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	16
	HGF- und nicht GM-CSF-abhängig regulierte Zielgene	$[(3a/1a \text{ und } 3b/1b) \text{ UND NICHT } (5a/1a \text{ oder } 5b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	28
	HGF- und weder KGF- noch GM-CSF regulierte Zielgene	$[(3a/1a \text{ und } 3b/1b) \text{ UND NICHT } (4a/1a \text{ oder } 4b/1b) \text{ UND NICHT } (5a/1a \text{ oder } 5b/1b)] >+1,3 \text{ oder } <-1,3$	13

Durch logisch verknüpfte Abfragen in ‚dchip1.3‘ wurden die Arraydaten der unterschiedlich behandelten Keratinozyten miteinander verglichen

1 = Arraydaten der ^{c-jun/-}Keratinozyten, Referenzwerte
 2 = Arraydaten der ^{HGF}Keratinozyten
 3 = Arraydaten der ^{KGF}Keratinozyten
 4 = Arraydaten der ^{GM-CSF}Keratinozyten
 (zur Nomenklatur vgl. auch Abb. 13)

Für detailliertere Auswertungen der mRNA-Expressionsprofile wurde eine Auswahl aus den potentiellen Zielgenen der einzelnen Zytokine getroffen. Dafür wurden Zielgene identifiziert, die im Kontext der Wundheilung interessante, potentielle Funktionen vermitteln und deren mRNA-Expressionsveränderungen innerhalb der Doppelbestimmung mindestens durch den Mittelwert aus beiden Versuchen ‚aussagekräftig‘ reguliert war. Die anhand dieser Kriterien ausgewählten Gene sind in Tabelle 4 aufgelistet. Dabei stellen der Transkriptionsfaktor FRA1 und das Zytokin CTGF Beispiele für HGF spezifisch induzierte Gene dar. TNFAIP3 und uPAR sind exemplarisch für eine überschneidende Induktion durch HGF und KGF ausgewählt worden. Der Differenzierungsmarker für suprabasale Zellen K10 ist ein Beispiel für eine negative Genregulation durch HGF und KGF.

Beispiele für Gene, deren mRNA-Expression durch keinen der drei Wachstumsfaktoren reguliert wurde, sind Involucrin und Calreticulin (Tab. 5 und Abb. 15F und G). Außerdem wurden uPA und VEGF als Beispiele für falsche Negativ-Ergebnisse in die Tabelle 5 aufgenommen, da sie als publizierte Zielgene sowohl von HGF (Fujiuchi et al., 2003, Wojta et al., 1999) als auch von KGF (Shin et al., 2002, Koyama et al., 2002) nach unseren Kriterien in primären Keratinozyten nicht reguliert sind.

Tabelle 4: Daten der ,GeneChip® Expression Array'-Analyse ausgewählter, HGF-abhängig regulierter Gene

Versuch A durch HGF regulierte Gene	,gene bank accession-no.'	,LocusLink ID-no.'	wt	wt SE	wt c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF c-jun ^{-/-}	KGF	KGF SE	KGF c-jun ^{-/-}	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF c-jun ^{-/-}
,connective tissue growth factor' (CTGF)	M92934	1490	244	5,5	1,63	150	8,8	269	8,9	1,8	152	8,6	1,02	144	4,3	-1,04
,FOS-like antigen-1' (FRA1)	BG251266	8061	350	10,3	-1,07	376	11,5	50 2	9,3	1,33	374	14,3	-1,01	371	7,7	-1,01
,keratin 10' (K10)	NM_000421	3858	2602	59,6	3,27	795	39,5	550	22,6	-1,45	621	45,7	-1,28	565	17,5	-1,41
,plasminogen activator, receptor' (uPAR)	U08839	5329	576	18,9	1,18	486	13,9	933	21,3	1,92	462	15,0	-1,05	571	24,0	1,17
	AY029180	5329	658	20,6	1,03	637	31,8	1029	26,7	1,62	649	19,6	1,02	674	16,1	1,06
,tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3' (TNFAIP3)	AI738896	7128	492	11,8	1,19	413	19,0	671	13,3	1,62	544	16,4	1,32	519	14,8	1,26
	NM_006290	7128	522	23,7	1,08	486	21,8	796	29,7	1,64	550	14,3	1,13	579	20,1	1,19
Versuch B durch HGF regulierte Gene	,gene bank accession-no.'	,LocusLink ID-no.'	wt	wt SE	wt c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF c-jun ^{-/-}	KGF	KGF SE	KGF c-jun ^{-/-}	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF c-jun ^{-/-}
,connective tissue growth factor' (CTGF)	M92934	1490	164	5,7	-1,68	276	8,3	551	11,2	2	337	9,6	1,22	291	7,8	1,05
,FOS-like antigen-1' (FRA1)	BG251266	8061	302	15,8	-1,22	386	10,4	541	11,8	1,4	349	12,2	-1,11	385	7,5	-1
,keratin 10' (K10)	NM_000421	3858	1740	27,9	2,61	666	23,5	503	18,9	-1,32	393	17,1	-1,69	594	35,4	-1,12
,plasminogen activator, receptor' (uPAR)	U08839	5329	327	12,9	-1,81	591	22,2	1093	27,8	1,85	966	18,9	1,63	687	9,3	1,16
	AY029180	5329	452	20,4	-1,4	632	37,2	1325	38,4	2,1	1041	22,3	1,65	811	24,5	1,28
,tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3' (TNFAIP3)	AI738896	7128	323	9,5	-1,8	581	19,3	786	23,3	1,35	1078	25,0	1,86	574	5,9	-1,01
	NM_006290	7128	378	24,2	-1,83	692	15,1	901	24,8	1,3	1075	31,2	1,55	649	17,7	-1,07

Die Expressionsprofile der in dieser Tabelle aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.

- Induktion der Expression im Vergleich zur Referenz (Schwellenwert: +1,3fache Regulation)
- Reduktion der Expression im Vergleich zur Referenz (Schwellenwert: -1,3fache Regulation)

Tabelle 5: Daten der ,GeneChip® Expression Array'-Analyse ausgewählter, nicht durch HGF regulierter Gene

Versuch A nicht durch HGF regulierte Gene	,gene bank accession-no.'	,LocusLink ID-no.'	wt	wt SE	wt c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF c-jun ^{-/-}	KGF	KGF SE	KGF c-jun ^{-/-}	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF c-jun ^{-/-}
,calreticulin'	AA910371	811	640	16,2	1,09	589	12,9	4767	20,3	-1,23	554	19,4	-1,06	580	11,3	-1,02
,involutrin'	NM_005547	3713	3227	31,4	1,08	2989	32,1	3313	119,4	1,11	2929	52,2	-1,02	2770	43,6	-1,08
,plasminogen activator, urokinase' (uPA)	NM_002658	5328	1108	37,5	-1,16	1324	18,8	1697	27,0	1,28	1386	29,9	1,05	1386	45,3	1,05
,vascular endothelial growth factor' (VEGF)	AF022375	7422	614	20,2	1,02	600	18,5	640,59	14,98	1,07	557	9,5	-1,08	658	21,5	1,1

Versuch B nicht durch HGF regulierte Gene	,gene bank accession-no.'	,LocusLink ID-no.'	wt	wt SE	wt c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF c-jun ^{-/-}	KGF	KGF SE	KGF c-jun ^{-/-}	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF c-jun ^{-/-}
,calreticulin'	AA910371	811	614	8,2	-1,02	628	18,4	558	20,5	-1,13	668	13,5	1,06	664	14,4	1,06
,involutrin'	NM_005547	3713	2170	34,5	-1,44	3119	75,4	3030	250	-1,03	3349	50,0	1,07	2866	59,4	-1,09
,plasminogen activator, urokinase' (uPA)	NM_002658	5328	778	29,8	-1,40	1303	30,7	1679	27,8	1,29	1958	40,1	1,5	1430	9,0	1,1
,vascular endothelial growth factor' (VEGF)	AF022375	7422	689	24,9	1,57	438	11,4	512	23,7	1,17	637	25,8	1,45	427	11,9	-1,03

Die Expressionsprofile der in dieser Tabelle aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.

- Induktion der Expression im Vergleich zur Referenz (Schwellenwert: +1,3fache Regulation)
- Reduktion der Expression im Vergleich zur Referenz (Schwellenwert: -1,3fache Regulation)

4.3.2.2 Auswertung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene

Die mRNA-Synthese von FRA1 und von CTGF wurde spezifisch durch HGF induziert (Abb. 15A und B). Dabei war die HGF-bedingte Induktion der FRA1-mRNA-Expression schwach und die Induktion der CTGF-mRNA-Expression mit 90 Prozent stark ausgeprägt. Die Behandlungen mit KGF oder GM-CSF beeinflussten die mRNA-Synthese von FRA1 und CTGF nicht wesentlich. Auch die Kokultur mit wildtyp Fibroblasten zeigten im Vergleich zu der Kokultur mit $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten keine Auswirkung auf den Transkript-Status von FRA1 oder CTGF in den primären Keratinozyten.

TNFAIP3 und uPAR sind Beispiele für gemeinsame Zielgene von HGF und KGF, deren mRNA-Expression induziert wurde und Keratin 10 für ein gemeinsames Zielgen der beiden Zytokine, dessen mRNA-Synthese reduziert wurde (Abb. 15C - E). Die TNFAIP3-mRNA-Expression wurde durch HGF und KGF mit 48 Prozent bzw. mit 47 Prozent stimuliert (Abb. 15C). Die Behandlung mit GM-CSF als auch die Kokultivierung mit wildtyp Fibroblasten hat keinen wesentlichen Effekt auf die mRNA-Expression von TNFAIP3. Im Gegensatz zu TNFAIP3 wurde uPAR durch HGF stark (98 Prozent), durch KGF weniger deutlich induziert (Abb. 15D). Auch bei uPAR wich die mRNA-Synthese in $\text{GM-CSF}^{\text{Ker}}\text{Ker}^{\text{Ker}}$ Keratinozyten und in wt^{Ker} Keratinozyten nicht wesentlich vom Referenzwert ab. Die Keratin 10-mRNA-Expression unbehandelter Keratinozyten wurde bereits beachtlich durch die Kokultivierung mit $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten beeinflusst, wobei die mRNA-Synthese in $c\text{-jun}^{-/-}\text{Ker}^{\text{Ker}}$ Keratinozyten um 194 Prozent reduziert wurde (Abb. 15F). Zusätzlich wurde der Transkript-Level von K10 durch HGF-Behandlung um weitere 38 Prozent inhibiert und nach KGF-Behandlung um weitere 31 Prozent. Der Einfluß von GM-CSF auf die K10-mRNA-Expression war nicht ‚aussagekräftig‘.

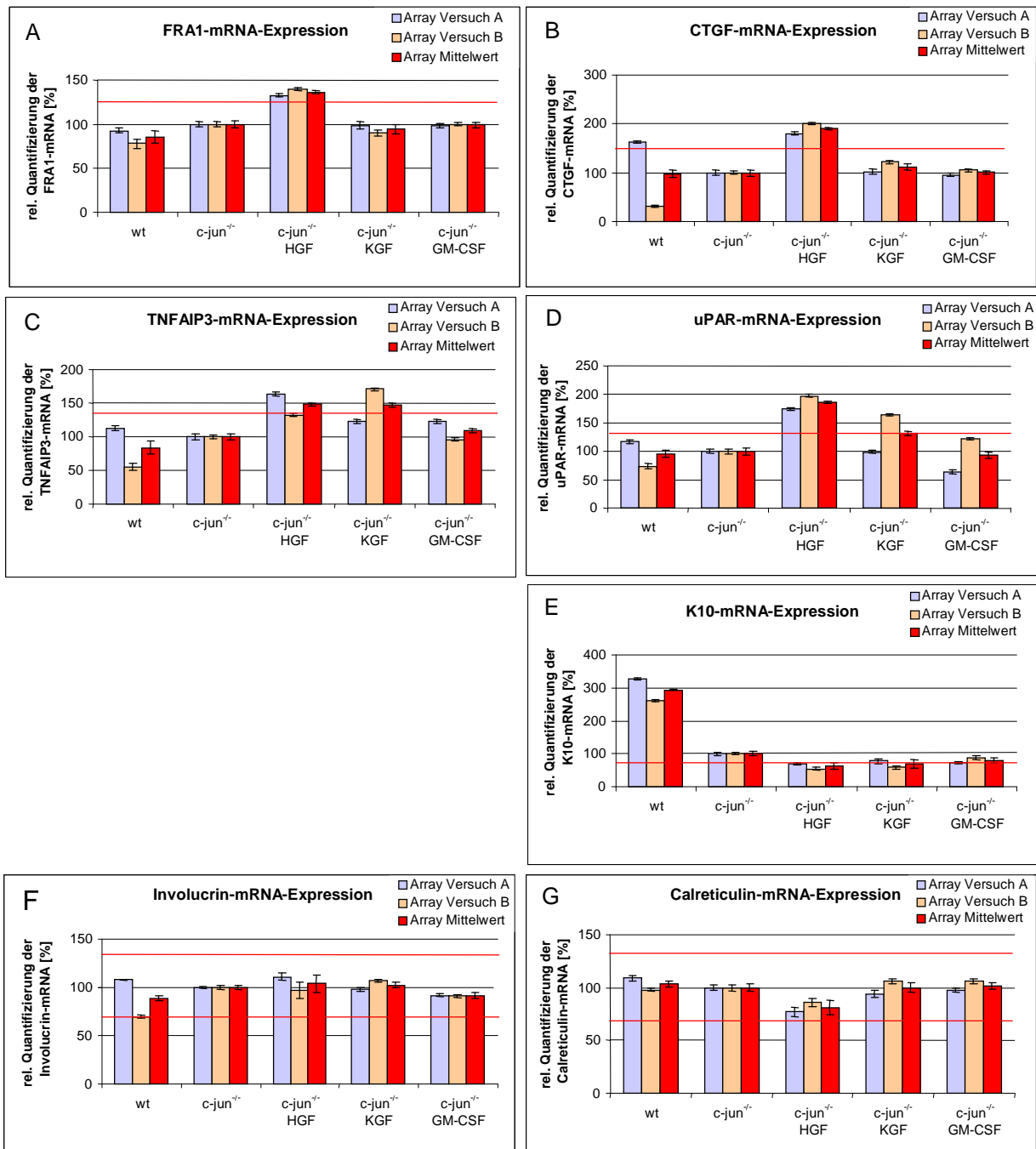


Abbildung 15: Vergleichende Darstellung der mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene von HGF und KGF sowie nicht regulierter Kontrollgene

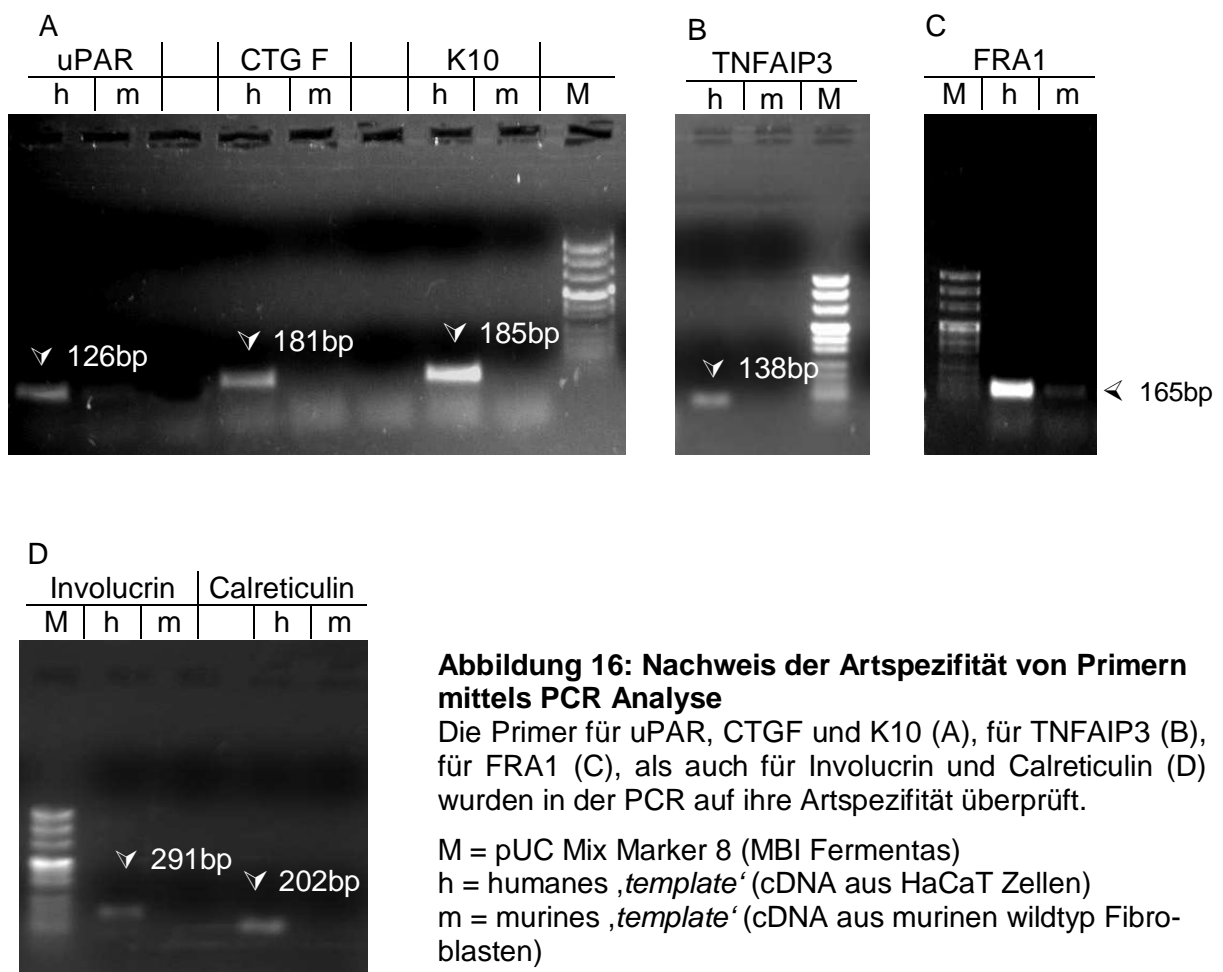
Durch vergleichende Array-Analysen konnten gemeinsame und spezifische Zielgene der Zytokine identifiziert werden. Zum Beispiel wurde die FRA1-(A) und CTGF-mRNA-Expression (B) spezifisch durch HGF und die TNFAIP3- (C) und uPAR-mRNA-Expression (D) sowohl durch HGF als auch durch KGF induziert. Die mRNA-Synthese von K10 (E) wurde durch HGF und KGF reduziert. Involucrin (F) und Calreticulin (G) wurden nicht durch HGF, KGF oder GM-CSF reguliert. Die relativen mRNA-Expressionswerte wurden in Bezug zu den Meßwerten der mRNA-Expression in den ^{c-jun}-/- Keratinozyten (Referenzwerte) ermittelt.

— Schwellenwert ‚aussagekräftiger‘ mRNA-Syntheseänderungen (ab ±1,3facher Regulation)

4.4 Validierung der Zielgenexpression durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR

Die Bestätigung der ‚GeneChip® Expression Array‘-Analysedaten erfolgte auf Transkript-Ebene durch die semiquantitative ‚realtime‘ PCR. Dafür wurden die mRNA-Expressionsprofile am Beispiel ausgewählter HGF- und KGF-regulierter Gene untersucht, deren mRNA Syntheseänderungen in den Array-Analysen ermittelt wurde (siehe Punkt 4.3.2.2; FRA1, CTGF, TNFAIP3, uPAR und K10; Abb. 15). Um das Vorkommen unspezifischer Regulationen der mRNA-Expression in den Array-Analysen auszuschließen, wurde auch die mRNA-Expression von nicht durch HGF-, KGF- oder GM-CSF-regulierten Genen exemplarisch an Involucrin und Calreticulin überprüft.

Da die zu analysierende Gesamt-RNA (bzw. die synthetisierte cDNA) analog zu den Vorversuchen sowohl aus humanen Keratinozyten als auch aus murinen Fibroblasten stammte, wurden die Primer für die semiquantitative ‚realtime‘ PCR auf ihre Artspezifität überprüft. Hierzu wurden die jeweiligen Primerpaare (für FRA1, CTGF, TNFAIP, uPAR, K10, Involucrin und Calretikulin) in PCR Analysen sowohl auf humaner als auch auf muriner cDNA getestet



(Abb. 16). Während spezifische Produkte mit allen Primerpaaren auf humanen ‚*templates*‘ amplifiziert wurden, konnten keine Amplifikate auf muriner cDNA generiert werden. Somit bestand keine Hinweis darauf, daß die Kontamination mit Gesamt-RNA aus murinen Fibroblasten einen störenden Einfluß auf die Validierung der Zielgenexpression in den primären Keratinozyten ausübt.

Nachdem die Artspezifität der Primer bestätigt werden konnte, wurden die mRNA-Expressionsprofile der ausgewählten Zielgene durch semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR überprüft. Dabei wurden die relativen mRNA-Expressionswerte der ausgewählten Gene analog zu der ‚*GeneChip*[®] Expression Array‘-Analyse im Verhältnis zu der mRNA Synthese der *c-jun*^{-/-} Keratinozyten (Referenzwert) errechnet. Die somit in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR ermittelten mRNA-Expressionsunterschiede entsprachen den Arraydaten sowohl hinsichtlich der Variationen zwischen den Versuchen A und B der Doppelbestimmung als auch hinsichtlich der Regulationen durch verschiedene Kulturbedingungen.

Auch die Mittelwerte der mRNA-Expressionswerte aus den Versuchen A und B stimmten zwischen der ‚*GeneChip*[®] Expression Array‘-Analyse und der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR überein. Somit konnten alle in den Array-Analysen festgestellten, zytokinabhängigen mRNA-Expressionsänderungen in der qPCR bestätigt werden (Abb. 17F-J). Sogar die geringe Induktion der FRA1-mRNA-Synthese durch HGF wurde in der qPCR reproduziert (Abb. 17F) und lag mit 42 Prozent nur marginal höher als in der Array-Auswertung. Eine Induktion der FRA1-mRNA-Expression in ^{KGF}Keratinozyten oder ^{wt}Keratinozyten trat analog zu den Array-Analysen nicht auf. Dagegen lag eine ‚aussagekräftige‘ Regulation der mRNA-Synthese von FRA1 in ^{GM-CSF}Keratinozyten in der qPCR im Gegensatz zu den Array-Analysen vor. Damit stellte sich die Regulation der mRNA-Expression von FRA1 als nicht nur potentiell HGF-, sondern eventuell auch geringfügig als GM-CSF-abhängig heraus.

Der Effekt von HGF auf die mRNA-Synthese von CTGF trat in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR mit einer Induktion von 518 Prozent wesentlich deutlicher als in der Array-Analyse auf (Abb. 17G). Jedoch fiel die CTGF-mRNA-Expression in der qPCR auch bei ^{wt}Keratinozyten sowie nach KGF- und GM-CSF-Behandlung höher als in der Array-Auswertung aus. Somit wurde CTGF zwar deutlich am stärksten, aber möglicherweise nicht ausschließlich durch HGF induziert.

Die mRNA-Expression von TNFAIP3 wurde durch die Behandlung mit HGF um 67 Prozent und mit KGF um 68 Prozent gesteigert (Abb. 17H). Dadurch wurde die in den Array-Analysen gefundene Induktion bestätigt. Die Behandlung mit GM-CSF als auch die Kokultivierung mit wildtyp Fibroblasten zeigte dagegen analog zu den Arraydaten keinen Einfluß auf die TNFAIP3-mRNA-Expression in primären Keratinozyten.

Auch die Induktion des uPAR-Transkript-Levels durch HGF- und KGF-Stimulierung konnte in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR reproduziert werden (Abb. 17I). Dabei entsprach die KGF-bedingte mRNA-Expressionssteigerung den Arraydaten. Im Gegensatz dazu fiel die HGF-bedingte Induktion von uPAR mit 110 Prozent höher aus als in den Array-Analysen. Die durchschnittliche uPAR-mRNA-Expression von ^{wt}Keratinozyten der Versuche A und B zeigte in Übereinstimmung mit den Arraydaten keine ‚aussagekräftige‘ Veränderung, obwohl im Versuchsansatz B eine Reduktion von immerhin 56 Prozent gemessen wurde. Bei GM-CSF-Behandlung konnte in der qPCR im Gegensatz zu den Array-Analysen eine schwache Induktion der uPAR-mRNA-Synthese von 33 Prozent ermittelt werden. Demnach wurde die uPAR-mRNA-Expression maßgeblich durch HGF, aber möglicherweise auch geringfügig durch KGF und GM-CSF induziert.

Die in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR gemessene mRNA-Expression von K10 war bei ^{wt}Keratinozyten um 590 Prozent höher als bei ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (Abb. 17J). Damit wurde der bereits starke Unterschied der Arraydaten noch verdeutlicht. Auch die Reduktion der K10-mRNA-Synthese durch HGF-, KGF- und GM-CSF-Behandlung fiel in der qPCR erheblich stärker aus. Dabei inhibierte HGF die K10-mRNA-Expression um weitere 71 Prozent, KGF um weitere 73 Prozent und GM-CSF um weitere 46 Prozent.

Mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR konnte ebenfalls bestätigt werden, daß die mRNA-Synthese von Involucrin als auch von Calreticulin in primären Keratinozyten weder durch die Zytokine HGF, KGF und GM-CSF, noch durch die Kokultivierung mit ^{c-jun^{-/-}}Fibroblasten beeinflußt wurde (Abb. 18).

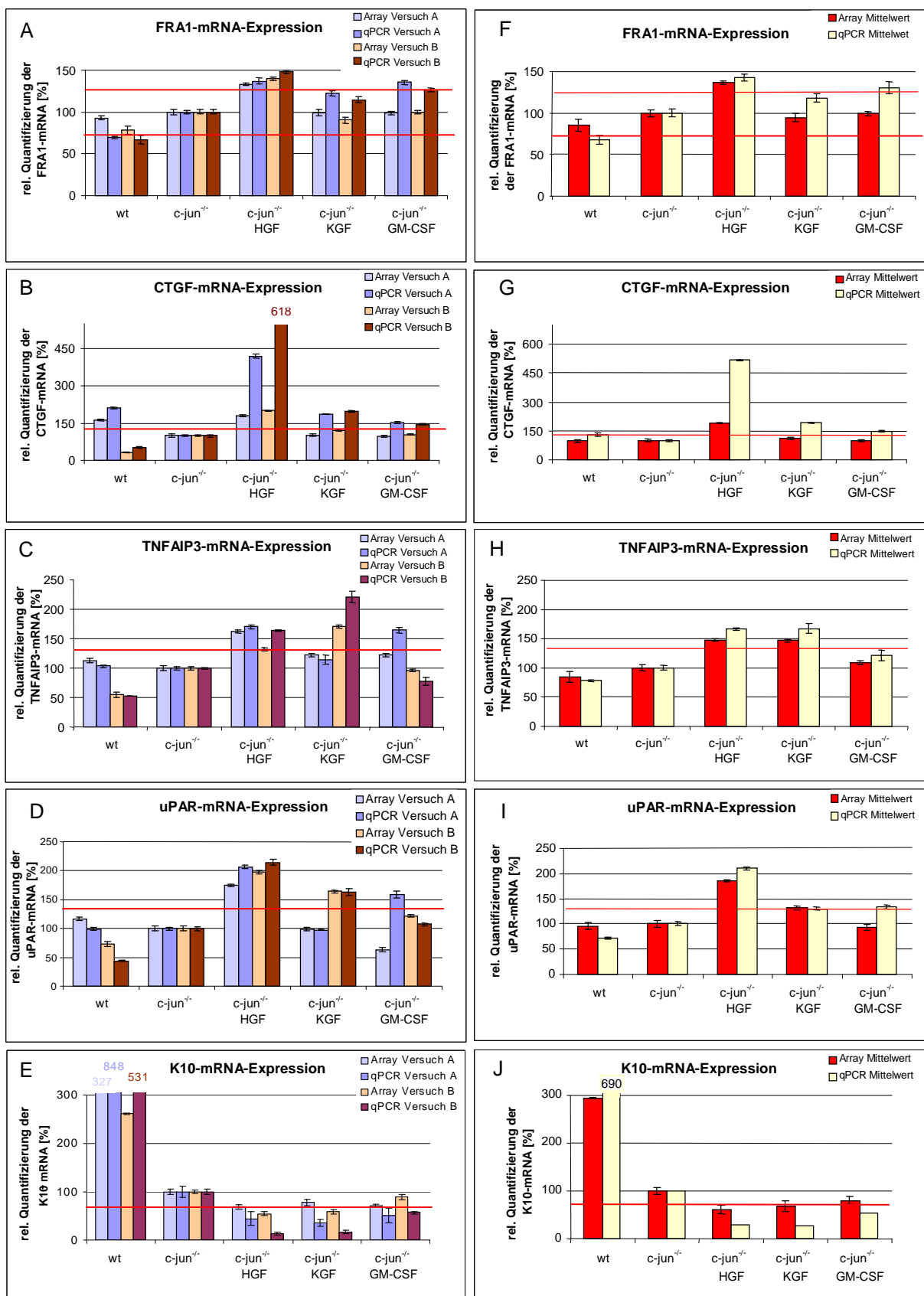


Abbildung 17: Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der qPCR ermittelten mRNA-Expressionsprofile ausgewählter Zielgene von HGF und KGF

Die Arraydaten der ausgewählten Zielgene von HGF und KGF wurden den Daten aus der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR gegenübergestellt. Dabei wurde sowohl die mRNA-Expression in den Versuchen A und B (A-E) als auch deren Mittelwerte (F-J) verglichen. Die relativen mRNA-Expressionswerte dieser Gene wurden in Bezug zu den Meßwerten der mRNA-Synthese in den $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten (Referenzwerte) ermittelt.

— Schwellenwert ‚aussagekräftiger‘ mRNA-Syntheseänderungen (ab $\pm 1,3$ facher Regulation)

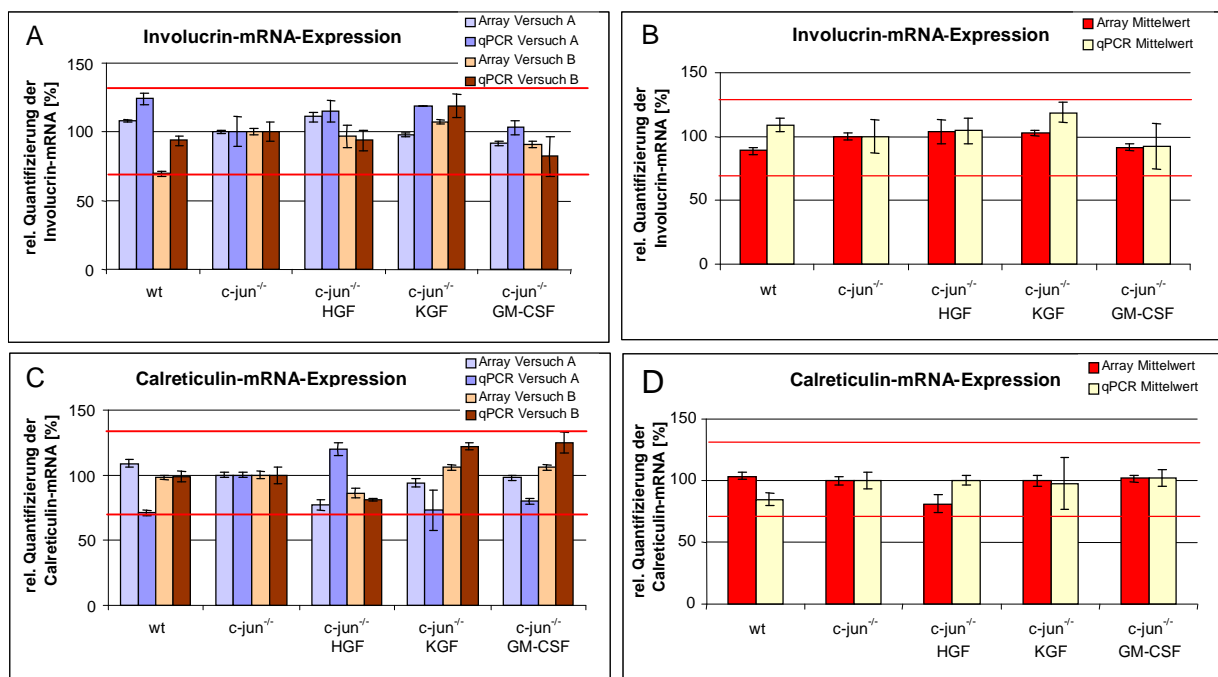


Abbildung 18: Vergleichende Darstellung der in den Array-Analysen und in der qPCR ermittelten mRNA-Expressionsprofile nicht regulierter Kontrollgene

Die Arraydaten der nicht regulierten Kontrollgene Involucrin und Calreticulin wurden den Daten aus der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR gegenübergestellt. Dabei wurde sowohl die mRNA-Expression in den Versuchen A und B (A-E) als auch deren Mittelwerte (F-J) verglichen. Die relativen mRNA-Expressionswerte dieser Gene wurden in Bezug zu den Meßwerten der mRNA-Synthese in den $c\text{-jun}^{-/-}$ Keratinozyten (Referenzwerte) ermittelt.

— Schwellenwert ‚aussagekräftiger‘ mRNA-Syntheseänderungen (ab $\pm 1,3$ facher Regulation)

4.5 Analyse der Proteinexpression von uPAR und CTGF im Western Immunoblot

Die in der ‚GeneChip[®] Expression Array‘-Analyse ermittelten mRNA-Expressionsprofile konnten am Beispiel von FRA1, CTGF, FNAFIP3, uPAR, K10, Involucrin und Calreticulin in einem unabhängigen Verfahren (semiquantitative ‚realtime‘ PCR) bestätigt werden. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob sich die quantitativen Unterschiede der mRNA-Synthese auch in den Proteinprodukten widerspiegeln. Dazu wurde die Proteinmenge von uPAR (50 kDa) und CTGF (38 kDa) untersucht, da die mRNA-Expression dieser Gene mit Abstand am stärksten durch HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF induziert wurde. Dafür wurden Gesamt-Proteinextrakte aus dem Versuchansatz B von ^{HGF}Keratinozyten, ^{KGF}Keratinozyten und ^{GM-CSF}Keratinozyten jeweils sechs Stunden nach Zytokinbehandlung im Western Immunoblot analysiert. Als Kontrolle dienten die Gesamt-Proteinextrakte aus dem Versuchansatz B von ^{wt}Keratinozyten und ^{c-jun/-}Keratinozyten.

Da die Gesamt-Proteinextrakte der Keratinozyten jedoch auch Proteine aus den kokultivierten murinen Fibroblasten enthielten, wurde die Kreuzreaktivität des anti-humanen uPAR-Antikörpers getestet. Dafür wurde eine Immunhistochemie an Paraffinschnitten muriner Wunden (vier, sechs und acht Tage nach Verwundung) durchgeführt (Abb. 19). Während die Positivkontrolle (humanes HCC) eine deutliche und positive Färbung der infiltrierenden, immunkompetenten Zellen aufwies, war in den murinen Gewebeschnitten keine zelluläre Färbung zu erkennen. Somit wurde eine gute Artspezifität des anti-humanen uPAR-Antikörpers belegt. Im Gegensatz dazu war ein vergleichbarer Nachweis der Artspezifität des murinen anti-humanen CTGF-Antikörpers nicht möglich, da in der Immunhistochemie, aber auch im Western Immunoblot, durch den anti-murinen Zweitantikörper unspezifische Kreuzreaktionen auftreten. Allerdings konnten die CTGF-spezifischen Banden im Western Immunoblot trotz unspezifischer Reaktionsprodukte des zweiten Antikörpers im Bereich des Molekulargewichtes von CTGF (38 kDa) identifiziert werden.

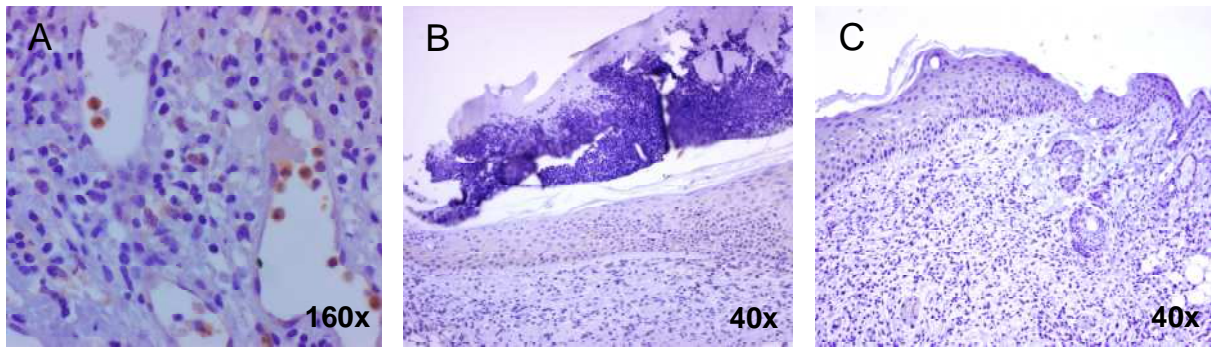


Abbildung 19: Nachweis der Artspezifität des anti-humanen uPAR-Antikörpers

Immunhistochemische Färbung gegen humanes uPAR (rotbraune Farbreaktion durch DAB Peroxidase Substratlösung) der Positivkontrolle (humanes HCC, A) und muriner Wunden vier Tage (B) und sechs Tage (C) nach Verwundung

In dem anschließend durchgeführten Western Immunoblot konnte die Induktion der Proteinbiosynthese von uPAR durch HGF und KGF bestätigt werden (Abb. 20A). Dabei war die Induktion der uPAR-Proteinexpression analog zu der uPAR-mRNA-Synthese durch HGF deutlich stärker ausgeprägt. Somit konnte belegt werden, daß die Induktion der uPAR-mRNA-Expression durch HGF und KGF sechs Stunden nach Applikation der Zytokine auch zu einer Erhöhung der uPAR-Proteinkonzentration führte (Abb. 20A und B).

Die geringste Proteinkonzentration von uPAR wurde trotz der Sekretion endogener Zytokine durch wildtyp Fibroblasten bei den ^{wt}Keratinocyten nachgewiesen (Abb. 20A). Hierdurch bestätigte sich die in den Array-Analysen und in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR ermittelte Reduktion der uPAR-mRNA-Synthese in den ^{wt}Keratinocyten auch auf Proteinebene (Abb. 20B).

Dagegen lag im Versuchsansatz B weder hinsichtlich der mRNA-Expression noch der Proteinexpression eine GM-CSF-bedingte Induktion von uPAR vor (Abb. 20A und B).

Die Proteinbiosynthese von CTGF veränderte sich in den zytokinbehandelten Kokulturen im Vergleich zu den unbehandelten Kokulturen nur geringfügig (Abb. 20A). Somit ließ sich die HGF-bedingte Induktion der CTGF-mRNA-Expression von 90 Prozent (Array-Analyse) bis 518 Prozent (semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR) auf Proteinebene nicht verifizieren.

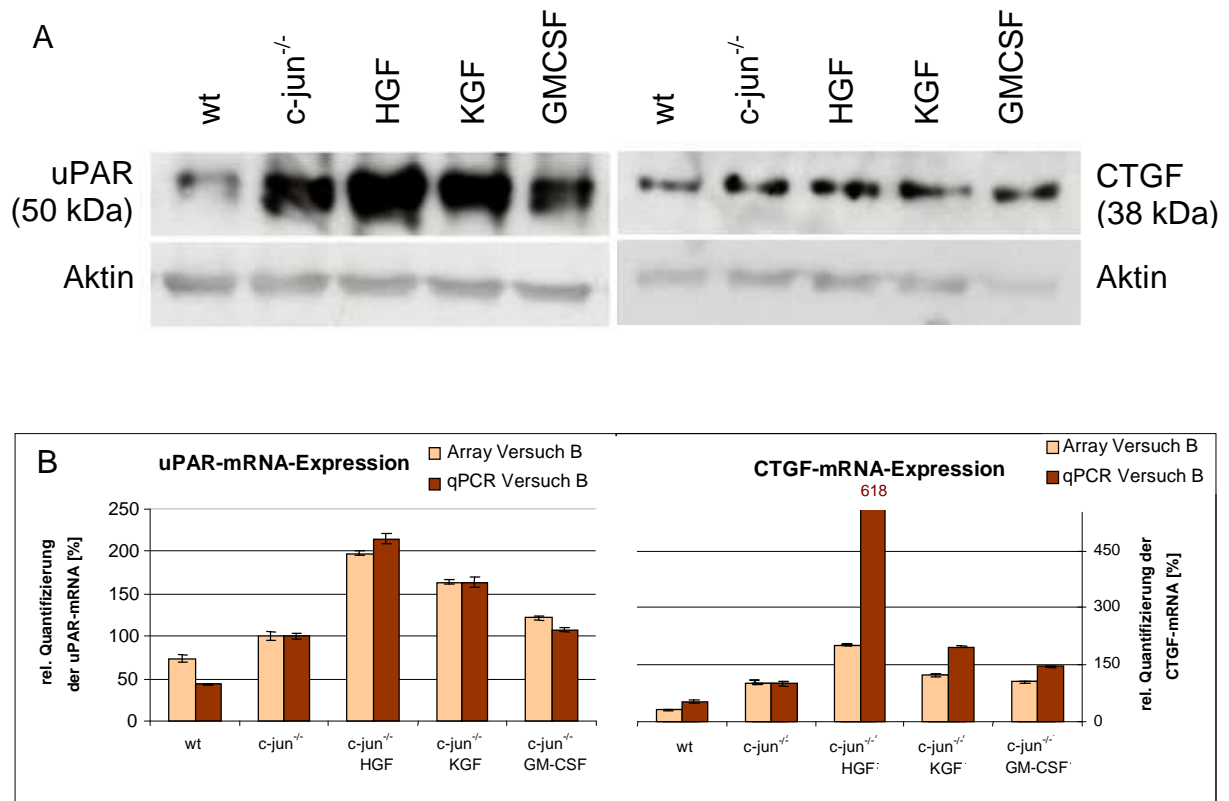


Abbildung 20: Vergleichende Darstellung der Protein- und mRNA-Expression von uPAR und CTGF

Primäre Keratinozyten in Kokultur mit c-jun^{-/-}Fibroblasten wurden drei (für die Isolierung der Gesamt-RNA) und sechs Stunden (für die Isolierung der Gesamt-Proteine) mit HGF, KGF und GM-CSF [jeweils 10 ng/ml] behandelt (Versuchsansatz B). Als Kontrollen wurden unbehandelte primäre Keratinozyten in Kokultur mit wildtyp Fibroblasten als auch mit c-jun^{-/-}Fibroblasten eingesetzt. Anschließend wurde die Proteinexpression von uPAR (50 kDa) und CTGF (38 kDa) im Western Immunoblot mit anti-humanen Antikörpern gegen uPAR und CTGF nachgewiesen, wobei Aktin als Ladekontrolle diente (A). Die relative mRNA-Expression beider Gene aus dem Versuchsansatz B, aus welchem auch die Gesamt-Proteinextrakte für die Western Immunoblot-Analysen stammten, wurden durch semiquantitative ‚realtime‘ PCR und Array-Analysen ermittelt (B).

4.6 Einfluß von uPAR auf die zytokinabhängige Migration von Keratinozyten

Um funktionelle Konsequenzen der HGF-bedingten Induktion der uPAR Proteinbiosynthese zu untersuchen, wurde der Einfluß von uPAR auf die Migration von Keratinozyten überprüft. Dafür wurde ein ‚scratch test‘ mit immortalisierten Zellen (humane HaCaT Zell-Linie) durchgeführt. Zur Etablierung des Migrationstest wurde zunächst untersucht, ob die Expression des uPA-Rezeptors (uPAR) als auch seines Liganden uPA in den HaCaT Zellen zytokinabhängig reguliert wird. Dafür wurde die mRNA- und die Proteinexpression von uPAR und uPA in HaCaT Zellen sowohl nach HGF-, KGF- und GM-CSF-Behandlung [jeweils 10 ng/ml], als auch ohne Zytokinstimulierung quantifiziert. In Anlehnung an die Vorexperimente mit primären Keratinozyten (siehe Punkt 4.2), wurde die mRNA-Synthese von uPAR und von uPA auch in den HaCaT Zellen drei Stunden nach Zytokinstimulierung und die Expression der Proteine sechs Stunden nach Zytokinstimulierung analysiert.

4.6.1 Nachweis der Expression von uPAR und seinem Liganden uPA in HaCaT Zellen

Die uPAR- und uPA-mRNA-Expression in der HaCaT Zell-Linie wurde mittels semiquantitativer ‚realtime‘ PCR untersucht (Abb. 21). Dabei dienten unbehandelte Zellen als Referenz.

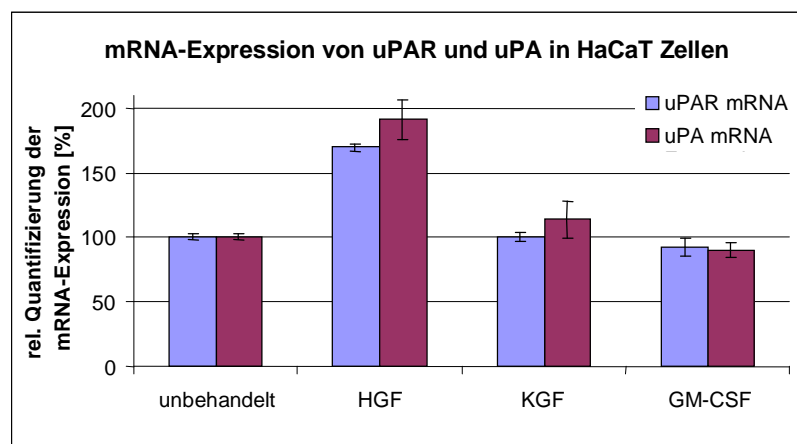


Abb. 21: Relative Quantifizierung der uPAR- und uPA-mRNA-Expression in HaCaT Zellen nach Behandlung mit HGF, KGF und GM-CSF

Die relative mRNA-Expression von uPAR und uPA wurde in unbehandelten HaCaT Zellen und in HaCaT Zellen drei Stunden nach HGF-, KGF- und GM-CSF-Behandlung [jeweils 10 ng/ml] in der semiquantitativen ‚realtime‘ PCR ermittelt. Dabei dienten Meßwerte der mRNA-Expression in den unbehandelten HaCaT Zellen als Referenz.

Während die relative uPAR-mRNA-Synthese in HaCaT Zellen drei Stunden nach HGF Stimulierung um 70 Prozent anstieg, veränderte sich die relative uPAR-mRNA-Expression nach Behandlung mit KGF oder mit GM-CSF unbedeutend. Die relative mRNA-Synthese von uPA nahm nach einer dreistündigen HGF-Stimulierung sogar um 91 Prozent zu, wogegen die Behandlungen mit KGF oder GM-CSF ebenfalls keinen wesentlichen Einfluß zeigten.

Die Proteinexpression von uPAR (50 kDa) und uPA (54 kDa) wurde in mit HGF-, KGF- oder GM-CSF-behandelten HaCaT Zellen im Western Immunoblot Verfahren überprüft. Dabei konnte bestätigt werden, daß HGF sowohl die uPAR- als auch die uPA-Proteinexpression in HaCaT Zellen induzierte (Abb. 22). Dagegen wirkte sich die Behandlung mit KGF oder GM-CSF nicht auf die Proteinmenge aus.

Somit konnte sowohl auf Transkript- als auch auf Proteinebene eine HGF-abhängige Induzierbarkeit von uPA und analog zu den primären Keratinozyten auch von uPAR nachgewiesen werden. Jedoch zeigten die HaCaT Zellen im Gegensatz zu den primären Keratinozyten keine uPAR-Regulation in Abhängigkeit von KGF.

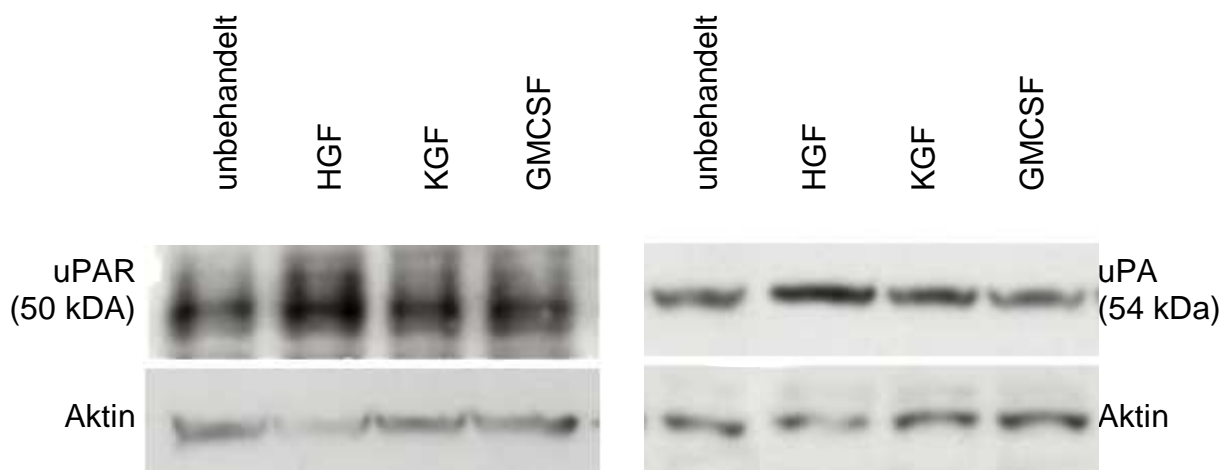


Abbildung 22: Nachweis der Proteinexpression von uPAR und uPA in HaCaT Zellen

HaCaT Zellen wurden für sechs Stunden ohne Zytokine (unbehandelte Kontrolle) als auch mit HGF, KGF und GM-CSF [jeweils 10 ng/ml] kultiviert. Anschließend wurde die Proteinexpression von uPAR (50 kDa) und uPA (54 kDa) im Western Immunoblot mit anti-humanem Antikörper gegen uPAR und uPA nachgewiesen, wobei Aktin als Ladekontrolle diente.

4.6.2 Auswirkung der Neutralisierung von uPAR auf die Migration von HaCaT Zellen

Nachdem bestätigt werden konnte, daß die Proteinbiosynthese von uPAR und uPA in HaCaT Zellen durch HGF induzierbar war, wurde die Funktion der uPAR-Expression in Bezug auf die Migration untersucht. Dafür wurde ein Migrationstest („*scratch test*“) mit Mitomycin C behandelten HaCaT Zellen durchgeführt. Mitomycin C ist ein Zytostatikum, welches den Aufbau des Spindelapparates und damit die mitotische Zellteilung verhindert. In einem Vorversuch wurde eine bis 85 prozentige Inhibierung der Proliferation durch eine dreistündige Behandlung von HaCaT Zellen mit Mitomycin C [5 µg/ml] nachgewiesen (Abb. 23).

Für die Untersuchung der Auswirkung von uPAR auf die zytokininduzierte Migration von

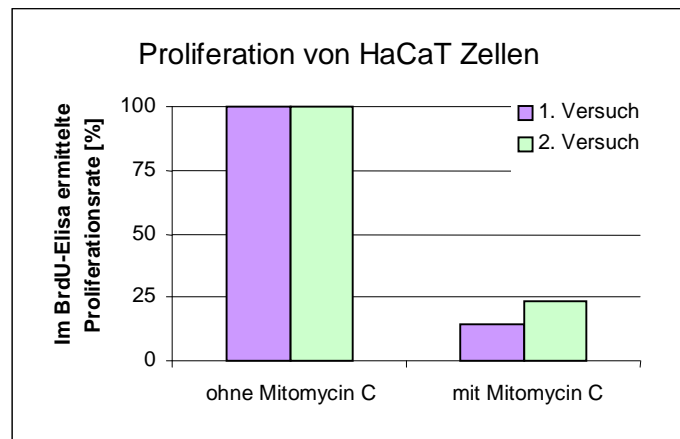


Abbildung 23: Proliferation von HaCaT Zellen nach Mitomycin C-Behandlung

HaCaT Zellen wurden mit einem Prozent FCS kultiviert und in zwei parallelen Ansätzen (Versuch 1 und 2) für drei Stunden mit Mitomycin C [5 µg/ml] behandelt. 24 Stunden später wurde die Proliferationsrate in einem BrdU-Elisa gemessen.

Keratinocyten wurden HaCaT Zellen nach den ausgetesteten Bedingungen (ein Prozent FCS, drei Stunden Mitomycin C-Behandlung) inkubiert. Anschließend wurde ein „*scratch*“ gesetzt und die freige kratzte Fläche digital photographiert (Abb. 24). Danach wurden die HaCaT Zellen mit HGF, KGF oder GM-CSF [je 10 ng/ml] stimuliert. Als Kontrolle dienten unbehandelte Zellen. Die Zellen wurden anschließend mit und ohne neutralisierendem uPAR-Antikörper [1,2 µg/ml] behandelt. Die Migration der HaCaT Zellen in die unbewachsenen Areale wurde nach 18 Stunden abermals photographisch dokumentiert (Abb. 24).

Die zellfreien Flächen zu Beginn des Versuchs (Stunde 0) und 18 Stunden später, sowie das jeweilige Verhältnis zueinander wurde für jeden Versuchsansatz errechnet. Um die relative Migrationsrate der HaCaT Zellen zu ermitteln, dienten die Daten der unbehandelten Zellen als Referenz (Abb. 25A). Die relativen Werte wurden von der relativen Migrationsrate der unbehandelten Zellen bereinigt, da die Repopulation der freige kratzten Fläche im ‚scratch test‘ bei unbehandelten HaCaT Zellen auf die Restaktivität der Proliferation trotz der Mitomycin C-Behandlung (ungefähr 20 Prozent) zurückzuführen war.

Bei den ohne neutralisierenden uPAR-Antikörper kultivierten HaCaT Zellen wurde die Migration signifikant durch HGF mit 102 Prozent im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle am stärksten induziert (Abb. 24A und B und Abb. 25). Auch die Repopulation der freige kratzten Fläche nahm bei Behandlung mit KGF signifikant um 30 Prozent zu (Abb. 24A und C und Abb. 25). Durch die Antikörper-vermittelte Neutralisierung von uPAR konnte die HGF-induzierte Migration signifikant um 48 Prozent (Abb. 24A und B und Abb. 25) reduziert werden. Die Repopulation der freien Fläche unter KGF-Behandlung wurde durch die uPAR-Inhibierung nicht signifikant vermindert (Abb. 24A und C und Abb. 25). Die Behandlung mit GM-CSF wirkte sich weder mit noch ohne neutralisierenden uPAR-Antikörper auf die Migration von HaCaT-Zellen aus (Abb. 24A und D und Abb. 25). Somit konnte nachgewiesen werden, daß uPAR an der HGF-induzierten Migration beteiligt ist.

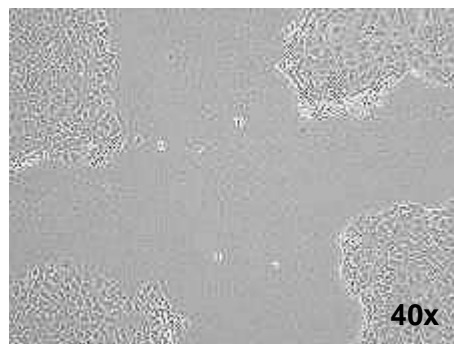
A

unbehandelte Kontrolle

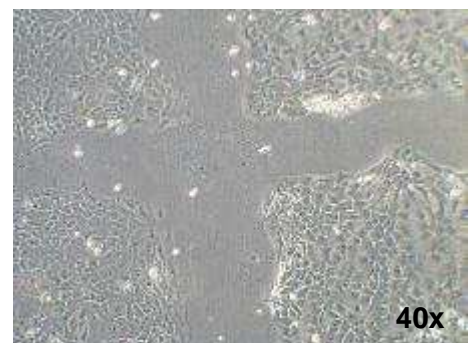
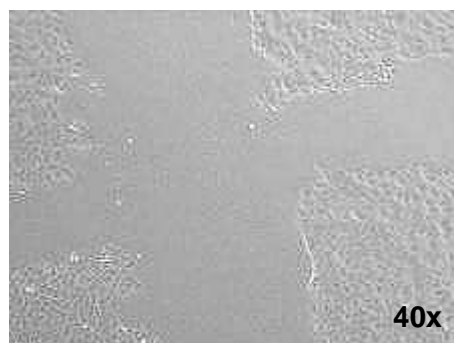
Stunde 0

18 Stunden

ohne
neutralisierenden
Antikörper gegen
uPAR



mit
neutralisierendem
Antikörper gegen
uPAR

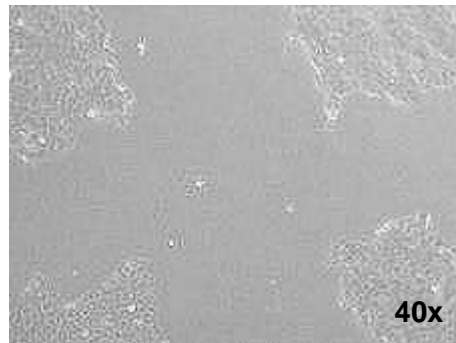


B
HGF-Behandlung

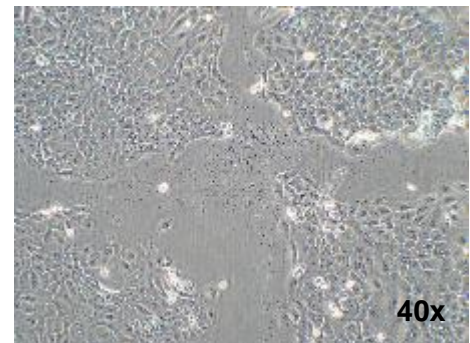
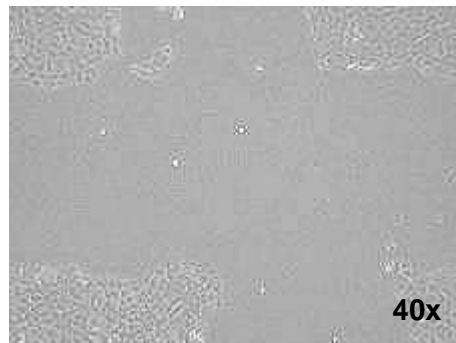
Stunde 0

18 Stunden

ohne
neutralisierenden
Antikörper gegen
uPAR



mit
neutralisierendem
Antikörper gegen
uPAR

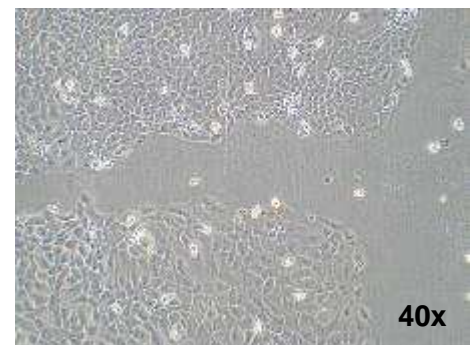
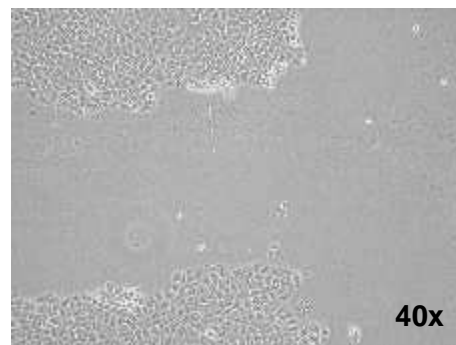


C
KGF-Behandlung

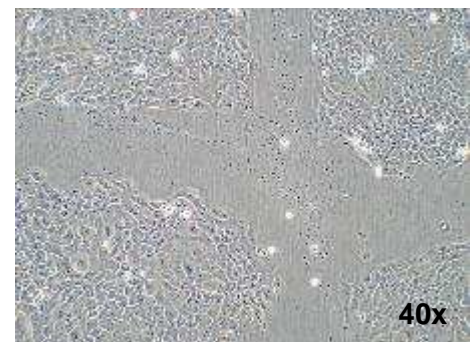
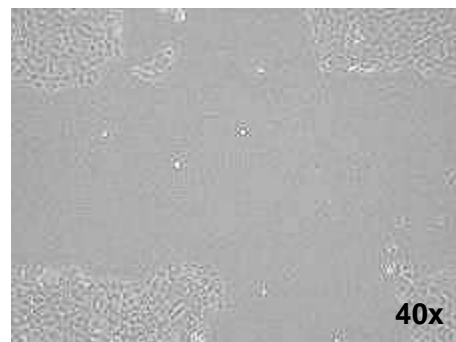
Stunde 0

18 Stunden

ohne
neutralisierenden
Antikörper gegen
uPAR



mit
neutralisierendem
Antikörper gegen
uPAR



D**GM-CSF-Behandlung**

Stunde 0

18 Stunden

ohne
neutralisierenden
Antikörper gegen
uPAR



mit
neutralisierendem
Antikörper gegen
uPAR



Abbildung 24: Dokumentation des ‚scratch test‘ von HaCaT Zellen ohne und mit neutralisierendem uPAR-Antikörper

Die Proliferation von HaCaT Zellen wurde durch eine dreistündige Einwirkung von Mitomycin C [5 µg/ml] weitgehend inhibiert. Danach wurden die Zellen ohne Zytokin (A), mit HGF (B), mit KGF (C) und mit GM-CSF (B), sowie jeweils mit und ohne neutralisierendem Antikörper gegen uPAR [1,2 µg/ml] behandelt. Nachdem der ‚scratch‘ gesetzt wurde (Stunde 0), erfolgte eine 18 stündige Inkubation.

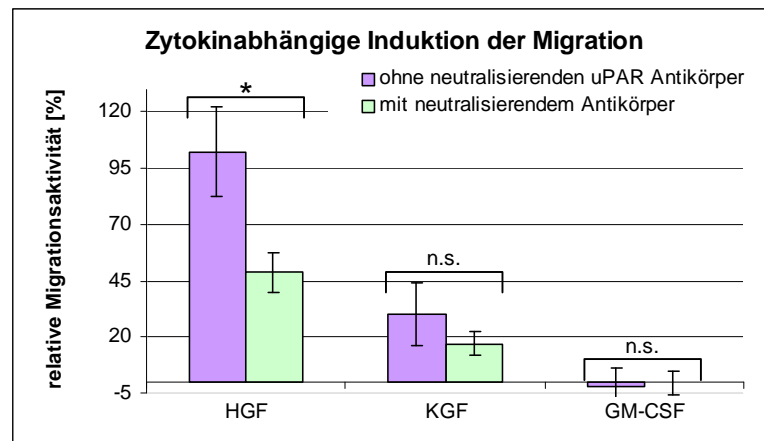


Abbildung 25: Einfluß der uPAR-Neutralisierung auf die Migration von HaCaT Zellen nach Stimulierung mit HGF, KGF und GM-CSF

Die Migration proliferationsinhibierter HaCaT Zellen wurde in einem ‚scratch test‘ mit und ohne Zytokinstimulierung (HGF, KGF und GM-CSF [10 ng/ml]), sowie mit und ohne neutralisierenden uPAR-Antikörper ([1,2 µg/ml]) analysiert. Die relative Migrationsaktivität von HaCaT Zellen nach 18 Stunden (Quotient aus zellfreier Fläche zu Beginn des Migrationstests und der zellfreien Fläche nach 18 Stunden) wurde von der basalen ‚Restproliferation‘ der nicht mit Zytokinen stimulierten Kontrollzellen bereinigt (A). Anhand der bereinigten relativen Migrationsaktivitäten wurde die prozentuale Beteiligung von uPAR an der HGF-, KGF-, und GM-CSF-induzierten Migration errechnet (B). Die Signifikanzen der Unterschiede wurden mittels Student t-Test ($p \leq 0,05$) ermittelt.

4.7 Expression von uPAR im Verlauf der kutanen Wundheilung

Die an primären und immortalisierten Keratinozyten generierten *in vitro* Daten bezüglich der HGF-abhängigen uPAR-Expression wurden *in vivo* auf ihre Bedeutung für die kutane Wundheilung analysiert. Dafür wurde sowohl die mRNA- als auch die Proteinsynthese von uPAR in der kutanen Wundheilung der Maus untersucht.

4.7.1 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von uPAR

Die mRNA-Expression von uPAR wurde in unverwundeter muriner Haut und in murinen ‚*full-thickness*‘ Wunden (sechs Stunden, ein Tag, drei Tage, fünf Tage und sieben Tage nach Verwundung) mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR untersucht (Abb. 26). Die relativen mRNA-Expressionswerte wurden dabei in Bezug auf den Transkript-Level in unverwundeter Haut ermittelt.

Bereits sechs Stunden nach Wundsetzung zeigte sich eine fünffache Induktion der uPAR-mRNA-Expression. Nach 24 Stunden stieg die mRNA-Synthese von uPAR um einen Faktor von 5.700 an. In der zwei Tage alten Wunde lag die Induktion der uPAR-mRNA-Expression nur unwesentlich höher und fällt fünf Tage nach Verwundung auf das 1.900fache und sieben Tage nach Verwundung auf das 400fache der mRNA-Synthese unverwundeter Haut ab. Damit stieg die uPAR-mRNA-Expression parallel zu der ermittelten HGF-mRNA-Expression (Abb. 7) schon in den ersten sechs Stunden der kutanen Wundheilung an, erreichte am zweiten Tag das Maximum der ermittelten mRNA-Synthesewerte und fiel dann innerhalb von wenigen Tagen wieder ab.

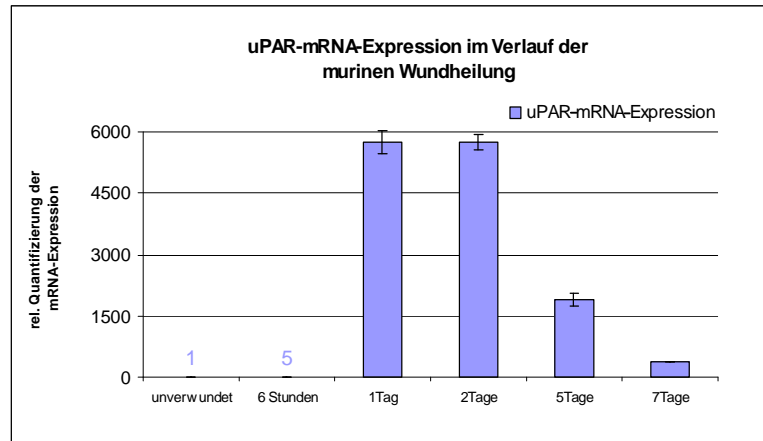


Abbildung 26: Nachweis der uPAR-mRNA-Expression in unverwundeter und verwundeter muriner Haut

Die relative mRNA-Expression von uPAR wurde in unverwundeter Haut, sowie sechs Stunden, ein Tag, zwei, fünf und sieben Tage nach Verletzung durch semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR analysiert (B). Dabei dienten die Meßwerte der uPAR-mRNA-Expression in unverwundeter Haut als Referenz.

4.7.2 Lokalisation von uPAR im Verlauf der kutanen Wundheilung

Mittels der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR konnte nachgewiesen werden, daß die mRNA-Synthese von uPAR in den ersten Tagen der Wundheilung sehr stark zunimmt. Dabei stimmt die mRNA-Expression von uPAR weitgehend mit der von HGF überein. Um die Lokalisation von uPAR innerhalb der verwundeten Haut auf Proteinebene zu analysieren, wurden Paraffinschnitte mit unverwundeter, muriner Haut und murinen Wunden immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen murines uPAR gefärbt (Abb. 27). Dabei wurden die Wunden zu den Zeitpunkten von vier, sechs, acht, zehn und sechzehn Tagen nach Verwundung untersucht. Am vierten Tag der Wundheilung lag eine flächendeckende Expression von uPAR in den reepithelisierenden Keratinozyten der ‚*migration-tongue*‘ vor, und auch in Fibroblasten innerhalb des Granulationsgewebes wurde uPAR stark exprimiert (Abb. 27A-E). Dagegen nahm die uPAR-Expression sowohl in den Keratinozyten (Abb. 27B) als auch in den Fibroblasten (Abb. 27B und C) im Randbereich der Wunde ab.

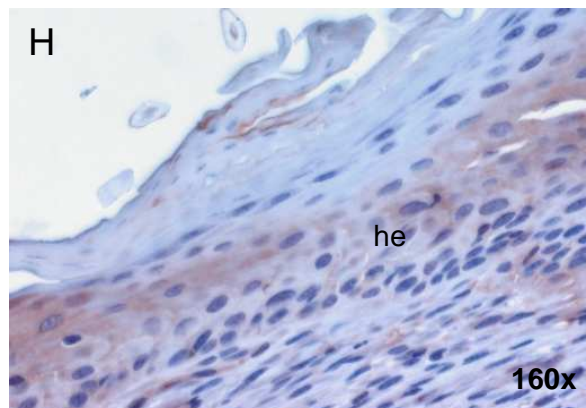
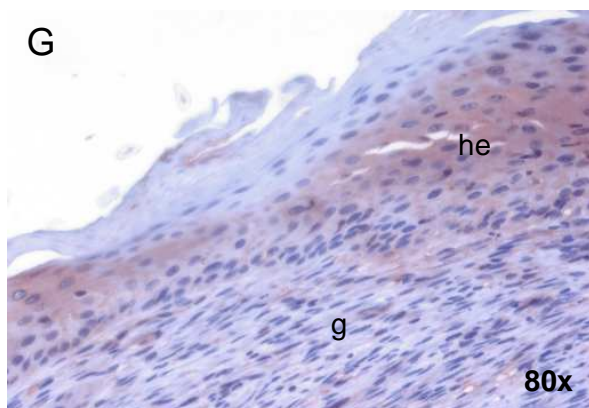
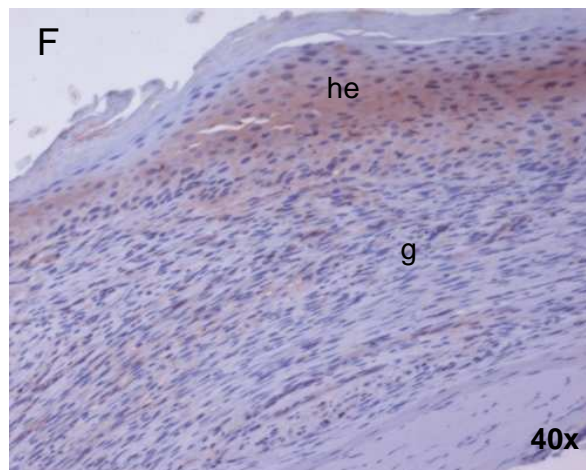
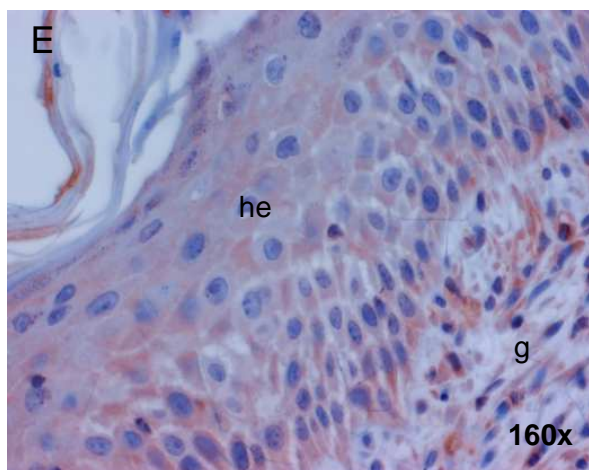
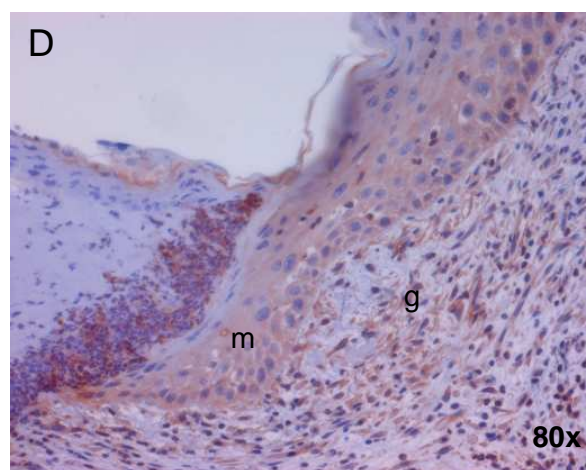
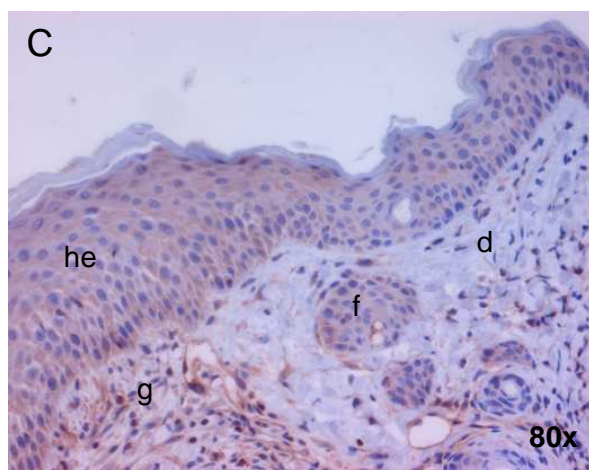
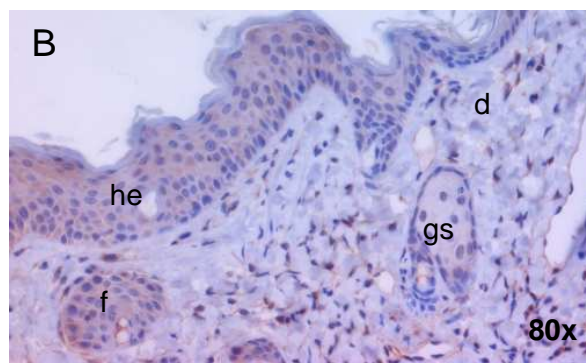
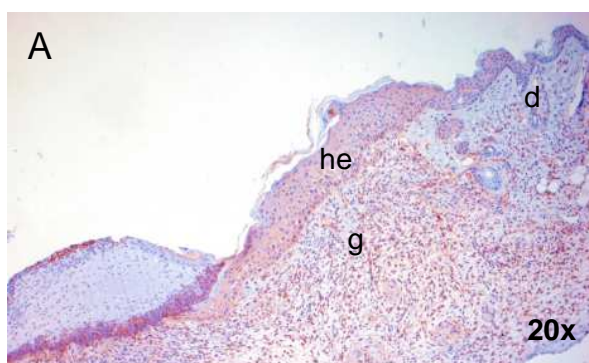
Sechs Tage nach der Wundsetzung wurde die uPAR-Expression in Fibroblasten des Granulationsgewebes stark reduziert (Abb. 27F). Innerhalb der hyperplastischen Epidermis war die uPAR-Expression weiterhin hoch, allerdings nur in den weitgehend unverhornten, suprabasa-

len Zellen (Abb. 27F-H). Im Vergleich dazu konnte uPAR in den basalen Keratinozyten nur schwach und in den keratinisierten Zellen des Stratum granulosum und corneum nicht mehr nachgewiesen werden.

Am achten Tag des Wundheilungsverlaufs war die Epidermis deutlich weniger hyperplastisch und die Schicht der nicht uPAR exprimierenden, keratinisierten Keratinozyten, als auch der unverhornten, suprabasalen Zellen stark komprimiert (Abb. 27I und J). In Letzteren lag immer noch eine schwache uPAR-Expression vor. Im Gegensatz dazu war die Expression von uPAR in den basalen Keratinozyten nicht mehr nachzuweisen. In einigen Teilen des Granulationsgewebes wurde uPAR von Fibroblasten noch schwach exprimiert, wogegen die uPAR-Expression hier am zehnten Tag der Wundheilung unterbunden war (Abb. 27K und L). In der Epidermis war das Protein noch bis zum 16. Tag nach Verwundung nachweisbar. Die Expression wurde jedoch mit abnehmender Hyperplasie von der Wundmitte zu den Wundrändern geringer (Abb. 27M-O).

In der Epidermis unverwundeter Haut (Abb. 27P) konnte kein Protein nachgewiesen werden, allerdings wurde uPAR in der Haarfollikelzwiebel sowie im vaskulären Endothel der Subkutis synthetisiert. Innerhalb der Dermis traten Färbungen auch in vereinzelt Fibroblasten auf.

Somit konnte sowohl mittels semiquantitativer ‚*realtime*‘ PCR als auch immunhistochemisch eine temporäre uPAR-Expression während der murinen Wundheilung der Haut nachgewiesen werden. Dabei wurde uPAR vor allem von den vitalen und migrierenden Keratinozyten exprimiert.



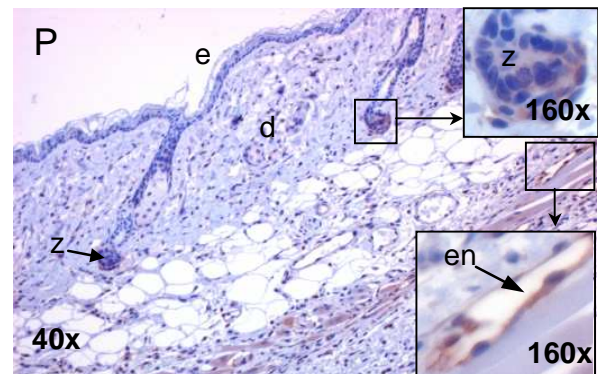
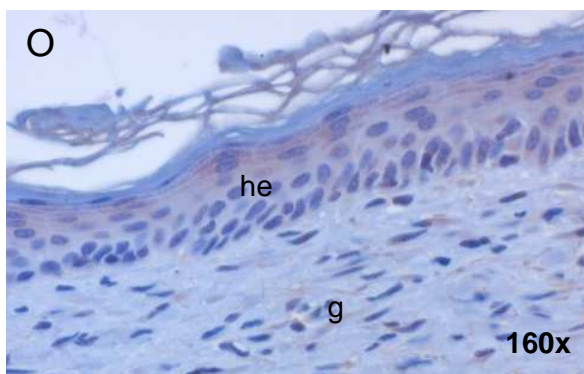
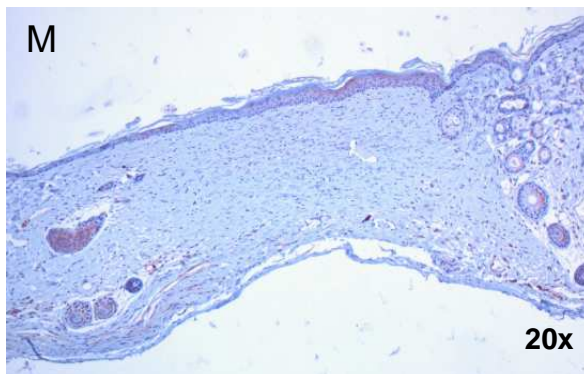
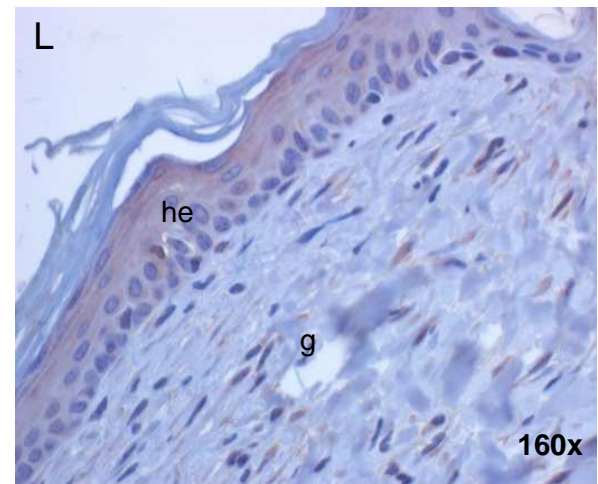
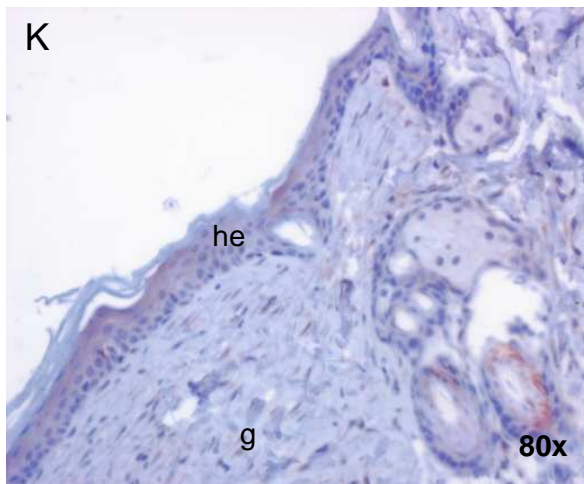
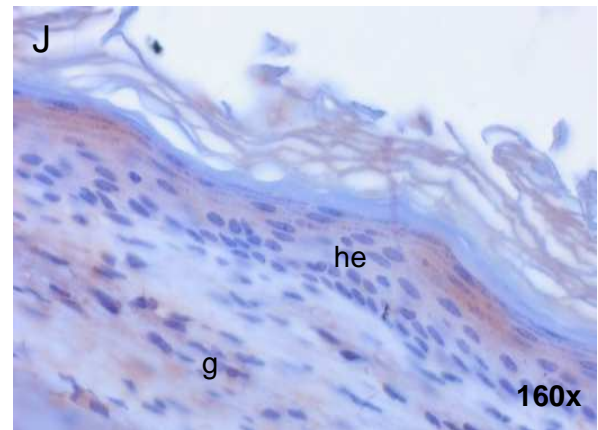
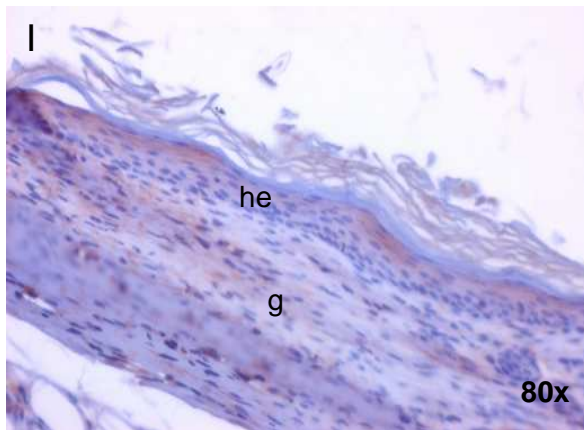


Abbildung 27: Expression des uPA-Rezeptors in unverwundeter und verwundeter muriner Haut

Zur Lokalisation der uPAR-Expression im Verlauf der Wundheilung wurde unverwundete und verwundete murine Haut immunhistochemisch mit einem Antikörper gegen murines uPAR (rotbraune Farbreaktion durch DAB Peroxidase Substratlösung) gefärbt. Am Tag 4 der Wundheilung (A-E) liegt eine ausgeprägte uPAR-Expression in Keratinozyten der ‚migration tongue‘ (D) und der hyperplastischen Epidermis (A, E), sowie in den Fibroblasten des Granulationsgewebes (D) vor. Dagegen nimmt die uPAR-Synthese am Wundrand in Keratinozyten (B) und in dermalen Fibroblasten (C) ab. Am 6.Tag der Wundheilung (F-H) wird uPAR in nicht keratinisierten, suprabasalen Keratinozyten und innerhalb einiger Areale des Granulationsgewebes exprimiert. An den Tagen 8 (I-J) und 10 (K-L) der Wundheilung finden sich Reste der uPAR-Expression in nicht keratinisierten, suprabasalen Keratinozyten. Dagegen wird uPAR innerhalb des Granulationsgewebes nicht mehr synthetisiert. Am 16.Tag der Wundheilung (M-O) ist die uPAR-Synthese nur noch in der hyperplastischen Epidermis der Wundmitte nachzuweisen. In der unverwundeten Haut (P) wird uPAR in der Haarfollikelzwiebel und in vaskulären Endothelien exprimiert (Pfeile), nicht dagegen in Keratinozyten oder Fibroblasten.

d	= Dermis	f	= Haarfollikel
e	= Epidermis	he	= hyperplastische Epidermis
en	= vaskuläres Endothel	m	= ‚migration tongue‘
g	= Granulationsgewebe	z	= Haarfollikelzwiebel
Gs	= Glandulae sebaceae (Talgdrüse)		

5 Diskussion

In der kutanen Wundheilung üben Wachstumsfaktoren wie HGF, KGF und GM-CSF vergleichbare, aber auch spezifische Einflüsse auf die Funktionen von Keratinozyten aus (Werner et al., 2003). Obwohl diese Zytokine in der Therapie von Wundheilungsstörungen an Bedeutung gewinnen (Groves et al., 2000, Nayeri et al., 2002, 2005, auf dem Keller et al., 2004), sind ihre spezifischen Wirkungen und die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen bislang kaum verstanden. Daher wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf die Genexpression von Keratinozyten erstmalig in einem realitätsnahen Kokultur-Wundheilungsmodell aus primären humanen Keratinozyten und c-jun defizienten murinen Fibroblasten untersucht.

5.1 MET- und HGF-Expression in der kutanen Wundheilung

Zunächst wurde die Expression von MET in Keratinozyten während der Wundheilung immunhistochemisch bestätigt, wobei die Verbreitung des Rezeptors innerhalb der ‚migration tongue‘ und der hyperplastischen Epidermis am vierten Tag nach Verletzung am stärksten ausgeprägt vorliegt. Die Expressionssteigerung des Rezeptors in den Keratinozyten während der frühen Phase der Wundheilung ist bereits publiziert, wobei der Zeitpunkt der höchsten Expression 24 Stunden vor dem hier untersuchten vierten Tag (Cowin et al., 2001) bzw. in dem Zeitraum von zwei bis vier Tagen nach Verletzung (Yoshida et al., 2003) beschrieben wird. Im Gegensatz zu der Expression des MET-Rezeptors wird die Proteinbiosynthese von HGF während der Wundheilung kontrovers diskutiert. Die höchste HGF-Expression in Ratten wird am siebten Tag, in Mäusen aber am zweiten Tag der kutanen Wundheilung gezeigt (Cowin et al., 2001, Yoshida et al., 2003). Die hier beschriebenen Daten bestätigen das mRNA Expressionsmaximum von HGF am zweiten Tag der murinen Wundheilung, weisen aber auch am siebten Tag eine erneute Steigerung der HGF-Expression nach. Die Diskrepanzen der MET-Expressionsdaten können einerseits auf artspezifische Unterschiede zwischen Ratte und Maus zurückzuführen sein. Andererseits müssen sich diese Angaben nicht zwingend widersprechen, zumal nach den hier generierten Daten die HGF-Expression am fünften Tag nach Verletzung zwischenzeitlich reduziert ist. Es ist möglich, daß die HGF-Expression bis zum zweiten Tag der Wundheilung stark ansteigt, am dritten Tag der Wundheilung, welches der früheste Zeitpunkt ist, zu dem die Expression von HGF in der kutanen Wundheilung der Ratte gemessen wurde (Cowin et al., 2003), vermutlich wieder reduziert wird und am siebten Tag

der Wundheilung erneut zunimmt. Diese erneute Induktion der HGF-Expression korreliert zeitlich mit einer vermehrten VEGF-Expression und der Rekrutierung von Endothelzellen in das Granulationsgewebe, wobei HGF die Synthese von VEGF in Keratinozyten stimuliert (Toyoda et al., 2001).

Demzufolge wird sowohl der MET-Rezeptor als auch sein Ligand HGF, insbesondere während der frühen Phase der Wundheilung, verstärkt exprimiert. Somit ist eine Beteiligung der HGF/MET-Interaktion in der kutanen Wundheilung anzunehmen. Entsprechende Auswirkungen von HGF auf den Wundheilungsprozeß wurden bereits in verschiedenen Tiermodellen untersucht (Toyoda et al., 2001, Nakanashi et al., 2002, Yoshida et al., 2003, siehe Punkt 1.3.9). Dabei wurden die HGF-spezifischen molekularen Wirkungsvorgänge in Keratinozyten bisher jedoch nicht analysiert. Um den direkten Einfluß von HGF auf das Expressionsmuster von Keratinozyten in Abgrenzung zu den Effekten der ebenfalls wundheilungsrelevanten Zytokine KGF und GM-CSF zu untersuchen, wurde die heterologe *feeder-layer* Kokultur aus humanen primären Keratinozyten und murinen c-jun^{-/-} Fibroblasten als Wundheilungsmodell etabliert.

5.2 Zytokinbedingte Effekte in der heterologen *feeder-layer* Kokultur

In der kutanen Wundheilung wird VEGF durch HGF und MMP10 durch KGF induziert (Madelener et al., 1996, Toyoda et al., 2001). Die Induktion beider Zielgene durch die jeweiligen Zytokine wurde auch in den primären Keratinozyten der heterologen *feeder-layer* Kokultur nachgewiesen, so daß dessen Eignung als Wundheilungsmodell (Maas-Szabowski et al., 2001) bestätigt werden konnte.

Die Expression von KGF und GM-CSF in Fibroblasten während der Wundheilung ist AP-1-abhängig und wird durch eine IL-1-vermittelte parakrine Interaktion zwischen Keratinozyten und Fibroblasten gesteuert (Szabowski et al., 2000). Zur Etablierung der heterologen *feeder-layer* Kokultur als Wundheilungsmodell wurde nachgewiesen, daß in c-jun-defizienten murinen Fibroblasten nicht nur die Expression der AP-1-regulierten Zytokine KGF und GM-CSF (Szabowski et al., 2000), sondern auch die Expression von HGF stark reduziert ist. Dies weist darauf hin, daß die Induktion von HGF in Fibroblasten ebenfalls von AP-1 abhängig sein könnte. Auch die Induktion von HGF unterliegt einem parakrinen Regelkreis zwischen Fibroblasten und Keratinozyten (Gron et al., 2002). Ob dieser jedoch IL-1-abhängig ist, war nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit und muß durch weitere Untersuchungen geklärt werden.

Nachdem die Synthese von endogenem HGF in der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur mit $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten ausgeschlossen werden konnte, wurden die Auswirkungen von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf die Morphologie von primären Keratinozyten analysiert. Die primären Keratinozyten-Kolonien weisen sowohl in Abhängigkeit des Genotyps der kokultivierten Fibroblasten (wildtyp oder $c\text{-jun}^{-/-}$) als auch in Abhängigkeit von der jeweiligen Zytokinbehandlung (mit HGF, KGF oder GM-CSF) typische morphologische Veränderungen auf. Die $c\text{-jun}^{-/-}$ -Keratinozyten bilden verkleinerte Kolonien aus vorwiegend keratinisierten Zellen, weil ihre Proliferation im Vergleich zu den wt -Keratinozyten durch die verminderte Zytokinsynthese der $c\text{-jun}^{-/-}$ Fibroblasten stark reduziert ist (Angel et al., 2002). Dagegen wird die Proliferation durch Stimulierung mit KGF, GM-CSF und vermutlich auch HGF so stark induziert, daß die Koloniegröße der wt -Keratinozyten wieder erreicht wird (Angel et al., 2002). Im Gegensatz zu den mit HGF und GM-CSF behandelten Keratinozyten-Kolonien bilden die Kolonieränder nach Stimulierung mit KGF eine weitgehend runde Kontur, außer bei Konfluenz von Kolonien mit mehr als einem Proliferationsherd. Dies steht wahrscheinlich in Verbindung mit der primär mitogenen Wirkung von KGF auf Keratinozyten, wogegen HGF zusätzlich die Migration fördert (Zeigler et al., 1996a). GM-CSF aktiviert ebenfalls die Proliferation in Keratinozyten (Breuhahn et al., 2000, Mann et al., 2001). Eine migrationsfördernde Wirkung von GM-CSF wurde bislang zwar nicht für primäre Keratinozyten, aber für vaskuläre Endothelzellen (Werner et al., 2003) und immortalisierten Keratinozyten (HaCaT Zellen, Müller et al., 1999) publiziert. Daher beruht die Asymmetrie der Keratinozyten-Kolonien nach HGF- und GM-CSF-Behandlung vermutlich auf einer migratorischen Wirkung dieser Zytokine, die bei GM-CSF allerdings im Vergleich zu HGF geringer ausfällt.

5.3 Zielgenanalysen

5.3.1 Validität der ermittelten mRNA-Expressionsunterschiede

An dem Kokulturmodell wurden die Auswirkungen der Stimulierung mit HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf das Expressionsmuster von primären Keratinozyten auf Transkript- und Proteinebene untersucht. Die dabei ermittelten mRNA-Expressionsregulationen der bekannten Zielgene (VEGF, MMP10 und IL-18) und der neu identifizierten Zielgene in Keratinozyten sind jedoch sowohl in der semiquantitativen ‚realtime‘ PCR als auch in den Array-Analysen schwach ausgeprägt (Abb. 12, 15 und 17). Hierfür gibt es mehrere Erklärungsmöglichkeiten. Zunächst teilen sich die analysierten primären Keratinozyten in Bezug auf den

Differenzierungsgrad in unterschiedliche Populationen (vitale, proliferierende Keratinozyten einerseits und terminal differenzierende Keratinozyten andererseits) mit abweichender mRNA-Expression auf. Infolgedessen entsteht ein Verdünnungseffekt, wodurch die Höhe der zytokinbedingten Expressionsänderungen möglicherweise in bestimmten Teilpopulationen durch die eventuell fehlende Reaktivität der Restpopulationen reduziert wird.

Weiterhin wird sowohl für HGF als auch für KGF in der Literatur beschrieben, daß diese Zytokine die Expression ihrer eigenen Rezeptoren induzieren (Gambarotta et al., 1996, Seol et al., 2000, Planz et al., 2001). Da die primären Keratinozyten durch die Kokultur mit c-jun^{-/-} Fibroblasten vor den Stimulierungsversuchen nur minimal mit diesen Wachstumsfaktoren versorgt wurden, ist eine reduzierte Expression ihrer Rezeptoren wahrscheinlich. Bei einer einmaligen Zytokinstimulierung könnte somit kurzfristig durch die verminderte Bioverfügbarkeit der Rezeptoren nur eine geringere Aktivierung der entsprechenden Signalwege erfolgen.

Außerdem hängt die Regulation von Genen in der *in vivo* Situation nicht nur von einem einzigen Wachstumsfaktor wie in dem vereinfachten Wundheilungsmodell mit den c-jun^{-/-} Fibroblasten ab, sondern von einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Zytokine, wodurch ihre Effekte potenziert werden können (Werner et al., 2003). Deshalb sind Genregulationen, die durch mehrere Wachstumsfaktoren beeinflusst werden (z.B.: die Expression von HGF in der *in vivo* Wundheilungssituation, Abb. 7B), bedeutend stärker ausgeprägt. Auch die Expressionsmuster verschiedener Zelltypen weisen extreme Unterschiede auf (Wilgenbus et al., 1999, Wasenius et al., 2003).

Dagegen wurde in dieser Arbeit nicht nur eine einmalige Behandlung mit jeweils einem einzigen Zytokin durchgeführt, sondern die Genexpressionen wurden zusätzlich zu einem sehr frühen Zeitpunkt (drei Stunden) nach der Zytokinstimulierung und in nur einem Zelltyp (primäre Keratinozyten) analysiert. In der Literatur beschriebene Genregulationen von Zielgenen bei vergleichbaren Stimulierungsbedingungen fallen ebenfalls gering und dennoch valide aus (Gille et al., 1998, Gerritsen et al., 2003, Yao et al., 2004).

Die Verlässlichkeit der generierten Daten wird durch die Auswertung der Doppelversuche A und B abgesichert, wobei die mittlere Genregulation beider Versuche sowohl ausschlaggebend für die Identifikation (Array-Analysen) als auch für die Verifikation (semiquantitative ‚*realtime*‘ PCR) der Zielgenregulationen ist. Allerdings ist die ermittelte Anzahl der in beiden

Versuchen A und B gleichzeitig regulierten Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF gering (Tab. 3B). Insbesondere von GM-CSF liegen wenige gemeinsame Zielgene aus den Versuchen A und B vor, weil bereits in Versuch B die Anzahl der Zielgene sehr gering ausfällt (Tab. 3A und B). Dies kann daran liegen, daß sich die GM-CSF-Behandlung erst nach sechs Stunden maßgeblich auf die Genregulation in primären Keratinozyten auswirkt, wie im Vorversuch für IL-18 gezeigt werden konnte (Abb.12). Daß auch die Schnittmengen der Zielgene von HGF und KGF aus den Versuch A und B gering ausfallen, kann im wesentlichen zwei Ursachen haben. Einerseits deutet dies auf eine erhöhte Sensitivität der mRNA-Expression von primären Keratinozyten in Kokultur mit c-jun^{-/-} Fibroblasten gegenüber äußeren Faktoren (Zellkultur- und Isolierungsbedingungen) hin. Die erhöhte Sensitivität der primären Keratinozyten beruht auf dem Verlust eines gesamten ‚Zytokinsets‘ bedingt durch den c-jun^{-/-} ‚knockout‘ in den Fibroblasten (Angel et al., 2002), da die primären Keratinozyten von parakrinen Interaktionen mit ‚feeder‘-Zellen abhängen. Damit ist nicht auszuschließen, daß ein Teil der nur in einem der beiden Versuche identifizierten Genregulationen nicht durch die jeweilige Zytokinstimulierung, sondern durch andere äußere Einflußfaktoren verursacht wird. Andererseits können Gene aber auch in einem der beiden Versuche durch die eingeschränkte Sensitivität der ‚GeneChip® Expression Arrays‘ trotz einer Expressionsveränderung als nicht reguliert (=falsch negative Ergebnisse) erscheinen. Falsch negative Ergebnisse sind eine nicht seltene Beobachtung bei Array-Auswertungen (DeLongchamp et al., 2004) und treten hier nachweislich bei den Arraydaten von VEGF auf (Tab. 4). Denn obwohl in den Array-Analysen die Regulation von VEGF weder durch HGF noch durch KGF delektiert wird, ist sie sowohl in der Literatur beschrieben (Gille et al., 1998, Koyama et al., 2002) als auch im Rahmen dieser Arbeit in den Vorversuchen mittels semiquantitativer ‚realtime‘ PCR bestätigt worden (Abb. 12). Zusätzlich erhöht sich die Wahrscheinlichkeit von falsch negativen Ergebnissen, weil die hier ermittelten Genregulationen aus den diskutierten Gründen schwach ausfallen. Weiterhin stammt ein Teil der analysierten Gesamt-RNA Isolate der heterologen ‚feeder-layer‘ Kokultur von kokultivierten Fibroblasten. Obwohl die Fibroblasten mRNA nicht auf den artspezifischen ‚Human Genome U133A 2.0 Arrays‘ hybridisiert, wirkt sie als Verdünnungsfaktor und kann somit zu falsch negativen Ergebnissen führen. Deshalb ist auf der Basis von Daten der ‚GeneChip® Expression Array‘-Analysen nur eine Positiv-Aussage über die mRNA-Expressionsregulationen von Genen möglich.

Somit ermöglicht der Array eine Vorselektion potentiell induzierter bzw. reduzierter Gene, wodurch in dieser Arbeit spezifisch und gemeinsam regulierte Zielgene der Zytokine HGF, KGF und GM-CSF in primären Keratinozyten identifiziert werden konnten. Da die Regulation dieser Gene bereits drei Stunden nach der Zytokinapplikation nachgewiesen wurde, handelt es sich hierbei mutmaßlich um direkte Zielgene, die durch die jeweiligen Zytokine ohne einen zwischengeschalteten autokrinen oder parakrinen Regelkreis aktiviert werden können (*„immediate early regulated genes“*).

5.3.2 Bestätigung der zytokinabhängigen Zielgenregulationen

Von den mittels Array-Analysen identifizierten Zielgenen wurde exemplarisch eine Auswahl von HGF-abhängig regulierten Zielgenen (FRA1, CTGF, TNFAIP3, uPAR und K10) getroffen, welche einer Vielfalt an Proteinfamilien angehören. So ist K10 ein Strukturprotein (Moll et al., 1982), CTGF ein Wachstumsfaktor (Bradham et al., 1991) und uPAR ein in der Zellmembran verankertes Rezeptormolekül (Ploug et al., 1991). FRA1 als *„leucin-zipper“* Protein (Matsui et al., 1990) und TNFAIP als Zink Finger Protein (Opipari et al., 1990) zählen zu den DNA-bindenden Proteinen.

Die zytokininduzierten Regulationen dieser durch HGF regulierten Gene wie auch der in der Literatur publizierten Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF konnten in der semiquantitativen *„realtime“* PCR bestätigt werden. Dabei wurde die für das Respirationsepithel beschriebene Induktion des Angiogenesefaktors VEGF durch KGF (Koyama et al., 2002) erstmalig in Keratinozyten nachgewiesen. In der Regel fielen die in der qPCR gemessenen Expressionsregulationen höher aus als in den Array-Analysen. Aufgrund dieser höheren Sensitivität der qPCR wurden hier auch schwache Regulationen der mRNA-Expression dargestellt, die in den *„GeneChip® Expression Array“*-Analysen nicht als *„aussagekräftig“* erscheinen.

Zusätzlich konnten auch die mRNA-Expressionsprofile von Involucrin, einem Differenzierungsmarker für suprabasale Keratinozyten (Banks-Schlegel et al., 1981) und Calreticulin, einem mit p53 interagierenden Protein des Endoplasmatischen Retikulums (Mesaeli et al., 2004), als nicht reguliert verifiziert werden. Durch die Reproduktion sowohl der zytokinabhängigen mRNA-Expressionsregulationen als auch der konstanten mRNA-Synthese der nicht regulierten Gene konnte die Validität des gewählten Versuchsaufbaus bestätigt werden.

Im Western Immunoblot wurde die zytokinvermittelte Induktion der Proteinbiosynthese beispielhaft bei den vergleichsweise stark regulierten Genen CTGF und uPAR überprüft. Wäh-

rend die ermittelten mRNA-Expressionsregulationen von uPAR eindeutig auf Proteinebene verifiziert wurden, konnte nach keiner der Zytokinbehandlungen ein eindeutiger Unterschied in der Konzentration von zellulärem CTGF Protein festgestellt werden. Somit konnte weder die starke Induktion der mRNA-Synthese durch HGF noch die nur in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR ermittelten schwachen Induktionen durch KGF und GM-CSF auf Proteinebene bestätigt werden. Dies könnte einerseits darauf beruhen, daß CTGF ein sezernierter Wachstumsfaktor ist, der sich deshalb im Zytoplasma auch bei Induktion nicht meßbar anreichert. Andererseits kann sich die auf Transkript-Ebene festgestellte Induktion aufgrund von posttranskriptionalen Regulationsmechanismen auch einfach nicht meßbar auf die Proteinmenge auswirken, wie für viele andere Genprodukte beschrieben (Fiorini et al., 2002, Sivko et al., 2004).

Im Fall von uPAR konnte bestätigt werden, daß sich sowohl die HGF- als auch die KGF-abhängige Induktion der mRNA-Expression auf die Proteinsynthese auswirken. Somit wurde erstmalig eine starke Induktion von uPAR durch HGF und eine mäßige Induktion von uPAR durch KGF in primären Keratinozyten auf Transkript- und Proteinebene nachgewiesen. Die nur in der semiquantitativen ‚*realtime*‘ PCR gemessene, schwache Induktion von uPAR durch GM-CSF konnte auf Proteinebene nicht verifiziert werden. Somit wurde nachgewiesen, daß die uPAR Proteinbiosynthese in primären Keratinozyten des Wundheilungsmodells durch HGF und KGF induziert wird, was die Grundlage für eine mögliche funktionelle Relevanz ist.

5.3.3 Funktionelle Aspekte der zytokinabhängigen Zielgenregulation

Neben der auf Proteinebene bestätigten Induktion von uPAR sind auch die nur auf mRNA-Expressionsebene nachgewiesenen Regulationen von FRA1, TNFAIP3 und K10 hinsichtlich ihrer potentiellen, funktionellen Bedeutung für die Wundheilung interessant. Diese identifizierten und verifizierten Zielgene von HGF haben einen bedeutenden Einfluß auf die Signaltransduktion von Zellen, wodurch sie - unter der Voraussetzung, daß HGF auch die Proteinmenge dieser Gene reguliert – an der zentralen Wirkung von HGF auf zahlreiche, für die kutane Wundheilung essentielle, zelluläre Prozesse wie Proliferation, Migration oder anti-Apoptose beteiligt wären. So ist FRA1 ein Transkriptionsfaktor der AP-1 Familie, dessen Aktivierung zu einer Erhöhung der Proliferation und Migration in epithelialen Zellen führt (Tkach et al., 2003, Burch et al., 2004). Ein funktioneller Zusammenhang zwischen der HGF-abhängigen Induktion von FRA1 und der HGF-abhängigen Proliferation wurde in der Literatur bislang nur für Schilddrüsenzellen beschrieben (Deleu et al., 1999). Zusammen mit den

hier generierten Daten legen diese publizierten Ergebnisse den Schluß nahe, daß die proliferative und die migratorische Wirkung von HGF auf primäre Keratinozyten in der Wundheilungssituation durch die Induktion von FRA1 unterstützt werden.

Die Induktion der TNFAIP3-mRNA-Expression durch HGF und KGF konnte erstmalig in dieser Arbeit in primären Keratinozyten in einem Wundheilungsmodell nachgewiesen werden. In vaskulären Endothelzellen schützt das Zink Finger Protein TNFAIP3 vor der TNF-, Fas- und NF- κ B-induzierten Apoptose (Daniel et al., 2004). Somit ist ein funktioneller Zusammenhang in der Wundheilung zwischen der zytokinabhängigen Induktion von TNFAIP3 und der HGF- (Mildner et al., 2002) und der KGF-vermittelten (Hines et al., 1996) anti-Apoptose in Keratinozyten denkbar.

Keratin 10 wird von Keratinozyten der Epidermis exprimiert, sobald die Zellen im Zuge der physiologischen Regeneration das Stratum basale verlassen (Moll et al., 1982). In den Differenzierungsprozessen der hyperplastischen Epidermis während der Wundheilung tritt die K10-Expression in suprabasalen Zellen jedoch verzögert ein (Smola et al., 1993). Dabei beeinflusst KGF die K10-Expression *indirekt*, indem es die Proliferation der Keratinozyten stimuliert, wodurch es zu einer Akkumulation undifferenzierter suprabasaler Keratinozyten mit verspäteter K10-Expression kommt (Andreadis et al., 2001). Allerdings konnte auch belegt werden, daß KGF die K10-Expression in aktivierten Keratinozyten während der Wundheilung *direkt* reduziert (McGowan et al., 1998). In Übereinstimmung damit wurde in dieser Arbeit nachgewiesen, daß die Keratin 10-mRNA-Expression in suprabasalen Keratinozyten bereits drei Stunden nach einer Stimulierung mit HGF, aber auch mit KGF und GM-CSF verringert vorliegt. Die KGF-bedingte Proliferation der Keratinozyten des Stratum basale hat zu diesem frühen Zeitpunkt noch nicht eingesetzt und kann folglich keine Auswirkung auf die K10-Expression suprabasaler Zellen haben. Somit wurde bestätigt, daß die K10-Synthese in aktivierten Keratinozyten während der Wundheilung durch HGF-, KGF- oder GM-CSF-Stimulierung auch *direkt* inhibiert werden kann.

Darüber hinaus ist Keratin 10 zwar ein Differenzierungsmarker von postmitotischen, suprabasalen Keratinozyten (Moll et al., 1982), übernimmt allerdings (im Gegensatz zu dem nicht durch HGF, KGF oder GM-CSF regulierten Involucrin) nicht nur die Funktion eines reinen Strukturproteins. Neuere Daten weisen darauf hin, daß K10 auch eine proliferationshemmende Wirkung auf die exprimierenden Keratinozyten selbst (Paramio et al., 2001) oder auf benachbarte Keratinozyten (Reichelt et al., 2002) ausübt. Somit läßt sich die Reduktion der

K10-mRNA-Expression durch HGF, KGF und GM-CSF auch im Hinblick auf die proliferationsfördernde Wirkung dieser Zytokine im Kontext der Aktivierung von Keratinozyten während der Wundheilung erklären.

Im Gegensatz zu FRA1, TNFAIP3 und K10 wurde die zytokinabhängige Induktion von uPAR nicht nur auf Transkript-, sondern auch auf Proteinebene nachgewiesen. Dabei konnte die Induktion der uPAR-Expression durch HGF und KGF in dieser Arbeit erstmals in primären Keratinozyten bestätigt werden, wobei die HGF-abhängige Stimulierung der uPAR-Synthese bereits in zahlreichen epithelialen Tumorzellen bekannt ist (Moriyama et al., 1999, Fujiuchi et al., 2003). Der uPA-Rezeptor ist an Prozessen der Wundheilung aber auch der Metastasierung von Tumorzellen beteiligt, indem er die Migration und Proliferation einerseits von Keratinozyten, Fibroblasten, immunkompetenten Zellen und Endothelzellen und andererseits von invasiv wachsenden Tumorzellen stimuliert (Kjoller, 2002). Dabei wirkt uPAR durch verschiedene Mechanismen.

Zunächst stimuliert der in der Membran verankerte Rezeptor die Migration, indem er die Degradation extrazellulärer Matrix erleichtert. Infolge der Liganden-Rezeptor Interaktion wird uPA an der Zelloberfläche konzentriert präsentiert, wo das Substrat Plasminogen durch die Enzymtätigkeit von uPA sieben- bis zehnfach beschleunigt zu fibrinolytischem Plasmin aktiviert wird (Kramer et al., 1995). HGF und KGF steigern nachweislich die uPA-Aktivität in Keratinozyten (Sato et al., 1995), was möglicherweise auf der hier nachgewiesenen HGF- oder KGF-abhängigen Induktion des uPA-Rezeptors beruht (Kramer et al., 1995). Andererseits könnte die gesteigerte uPA-Aktivität auf einer HGF- oder KGF-bedingten Induktion des Liganden selbst beruhen, welche allerdings bislang nur in verschiedenen Tumorzellen (Shin et al., 2002, Hall et al., 2004), jedoch nicht in primären Keratinozyten beschrieben wurde. Auch die hier generierten Arraydaten weisen im Gegensatz zu uPAR nicht auf eine Induktion des Liganden uPA in den primären Keratinozyten durch HGF, KGF oder GM-CSF hin, wogegen in den immortalisierten HaCaT-Zellen (Derivate eines Plattenepithelkarzinoms) eine HGF-abhängige Induktion sowohl der uPA-mRNA-Expression als auch der uPA-Proteinbiosynthese nachgewiesen wurde.

Interessanter Weise aktiviert uPA nicht nur Plasminogen, sondern auch HGF (Naldini et al., 1995), so daß durch die Liganden-Rezeptor-Interaktion mit dem membranständigen uPAR höchstwahrscheinlich neben Plasmin auch aktiviertes HGF an der Zelloberfläche konzentriert

wird. Somit könnte uPAR nicht nur die Aktivierung des HGF/MET-Signaltransduktionssystems, sondern damit auch indirekt die proliferative und migratorische Wirkung von HGF und durch einen positiven Rückkopplungsmechanismus die eigene Expression stimulieren.

Weiterhin ist uPAR auch selbst in der Lage, intrazelluläre Signalwege zu aktivieren und stimuliert auf diese Weise sowohl die Migration als auch die Proliferation von Keratinozyten (Kjoller, 2002). Da der uPA-Rezeptor keine zytoplasmatische Domäne besitzt, wird die intrazelluläre Signaltransduktion durch assoziierte, transmembrane Proteine wie Integrine (z.B.: Integrin $\alpha 5 \beta 1$) vermittelt (Ossowski et al., 2000).

Somit übt uPAR einen bedeutenden Einfluß auf die Proliferation und besonders die Migration von Zellen aus, welche für den Ablauf der kutanen Wundheilung aber auch der Karzinogenese und Metastasierung essentiell sind. Deshalb wurden hier die funktionalen Aspekte der durch HGF, KGF und GM-CSF regulierten Zielgenexpressionen in Keratinozyten am Beispiel der migratorischen Wirkung von uPAR untersucht.

Der positive Einfluß von uPAR auf die Migration von Keratinozyten konnte bereits bestätigt werden (Reinartz et al., 1994), allerdings ist dabei der Stellenwert von uPAR bei der HGF-, KGF- oder GM-CSF-induzierten Migration nicht bekannt und wurde von hier in einem sogenannten ‚scratch test‘ mit neutralisierendem Antikörper gegen uPAR und Mitomycin C zur Hemmung der Proliferation analysiert. Dafür wurde ein gebräuchliches *in vitro* Modell aus konfluenten immortalisierten Keratinozyten (HaCaT Zellen) eingesetzt (Buth et al., 2004, Uitto et al., 2005).

Obwohl in der Literatur beschrieben ist, daß mittels GM-CSF-Behandlung die Migration von HaCaT Zellen stimuliert werden kann (Müller et al., 1999), konnte in dieser Arbeit kein vergleichbarer Effekt nachgewiesen werden. Allerdings wurde hier eine 10fach geringere GM-CSF-Konzentration eingesetzt. KGF stimuliert als Mitogen hauptsächlich die Proliferation von Keratinozyten und übt einen zu vernachlässigenden Einfluß auf die Migration aus (Zeigler et al., 1996a). Deshalb ist die signifikante Repopulation der zellfreien Fläche im ‚scratch test‘ unter KGF-Behandlung vermutlich hauptsächlich einer Erhöhung der verbleibenden Proliferationsaktivität trotz Mitomycin C-Behandlung zuzuschreiben. Dabei hat die Neutralisierung von uPAR keine signifikante Auswirkung, obwohl uPAR auch die Proliferation von Zellen stimulieren kann (Kjoller, 2002). Möglicherweise zeigt die uPAR-Neutralisierung hier keinen eindeutigen Effekt, weil im Gegensatz zu den primären Keratinozyten in den HaCaT Zellen keine KGF-abhängige Induktion von uPAR vorliegt.

Die Migrationsaktivität der Keratinozyten wird eindeutig durch HGF stimuliert, was auch in der Literatur publiziert ist (Sato et al., 1995, Zeigler et al., 1996a). Weiterhin konnte erstmalig gezeigt werden, daß uPAR an der HGF-bedingten Migration von Keratinozyten signifikant beteiligt ist. Die Migrationsaktivität der HGF-behandelten Keratinozyten liegt allerdings auch nach der Antikörper-vermittelten Neutralisierung von uPAR über dem Niveau der unbehandelten Kontrolle. Für diesen bedingten Einfluß der uPAR-Neutralisierung auf die HGF-abhängige Migration von HaCaT Zellen gibt es unterschiedliche Gründe. Einerseits entsteht bei der funktionellen Inhibierung von Molekülen durch neutralisierende Antikörper ein stöchiometrisches Gleichgewicht zwischen Antigen-gebundenem und -ungebundenem Antikörper, was eine 100 prozentige Inhibierung verhindern kann. Andererseits wurde an uPAR-defizienten Mäusen gezeigt, daß die fibrinolytische Wirkung von uPAR in der kutanen Wundheilung kompensiert werden kann (Bugge et al., 1996). Diese Kompensation kann durch katabole Enzyme erfolgen, die teilweise ebenfalls HGF-abhängig induziert werden können und die Migration von Keratinozyten fördern, wie beispielsweise die Matrix Metalloproteinasen 9 (McCawley et al., 1998), 1 und 3 (Dunsmore et al., 1996). Demnach kann die Wirkung von uPAR auf die Degradation extrazellulärer Matrix durch andere Faktoren ersetzt werden.

Somit konnte in dem Migrationstest erstmalig gezeigt werden, daß uPAR an der HGF-induzierten Migration beteiligt ist. Dabei könnte die migrationsfördernde Wirkung der HGF-abhängigen Induktion von uPAR nicht nur für das Verständnis der Funktion dieser Zytokine in der kutanen Wundheilung, sondern auch in der Karzinogenese bedeutsam sein. Besonders die Beteiligung von uPAR an der Migration von HaCaT-Zellen, aber auch der potentielle Anteil von uPAR, FRA1 und TNFAIP3 an der proliferativen bzw. migratorischen oder anti-apoptotischen Wirkung von HGF auf primäre Keratinozyten fördert nicht nur den Wundheilungsprozeß. Unkontrolliert könnten gerade diese zellulären Prozesse zur malignen Transformation und Metastasierung beitragen. Die durch HGF-induzierten Gene FRA1, TNFAIP3 und uPAR stimulieren in epithelialen Tumorzellen nachweislich das invasive Wachstum oder die Widerstandsfähigkeit gegen die Induktion von Apoptose (Mazar et al., 1999, Iyengar et al., 2003, Milde-Langosch et al., 2004). Demzufolge ist eine stimulierende Wirkung von Wachstumsfaktoren mit potentiell tumorigenem Wirkspektrum auf die Entstehung von malignen Tumoren nicht auszuschließen (Esther et al., 1999). Unter diesem Gesichtspunkt sind Applikationen von HGF aber auch von KGF und GM-CSF bei Patienten mit Wundheilungsstörun-

gen (Groves et al., 2000, Nayeri et al., 2002, 2005, auf dem Keller et al., 2004) kritisch zu hinterfragen.

5.3.4 *In vivo* Bedeutung der HGF-vermittelten Induktion der uPAR-Expression

Zur Untersuchung, ob sich die HGF-bedingte Induktion der uPAR-Expression auf die *in vivo* Situation in der Wundheilung übertragen läßt, wurde die Expression von uPAR in der kutanen Wundheilung analysiert. Allerdings konnte bei der relativen Quantifizierung der mRNA-Expression von uPAR nicht zwischen Keratinozyten einerseits und Fibroblasten, immunkompetenten Zellen (Makrophagen, Granulozyten) und Endothelzellen andererseits differenziert werden. Immunhistochemisch wurde nachgewiesen, daß die uPAR-Expression in den Fibroblasten des Granulationsgewebes am sechsten Tag der Wundheilung stark reduziert und am achten Tag der Wundheilung nahezu eingestellt ist. Somit kann nur die Messung der mRNA-Expression von uPAR am siebten Tag hauptsächlich auf Keratinozyten zurückgeführt werden. Die mRNA-Synthese von uPAR wurde an den vorherigen Tagen gemeinsam von Keratinozyten, Fibroblasten, immunkompetenten Zellen und Endothelzellen quantifiziert, wodurch sich auch erklären läßt, weshalb trotz der Annahme, daß uPAR durch HGF induziert wird, die HGF- und die uPAR-mRNA-Expression nicht in allen Fällen parallel verlaufen.

Auf Proteinebene konnte nachgewiesen werden, daß uPAR nicht in epidermalen Keratinozyten und dermalen Fibroblasten unverwundeter Haut exprimiert wird. Weiterhin wurde erstmals belegt, daß uPAR im Verlauf der murinen Wundheilung nicht nur bis zum dritten Tag nach Verletzung exprimiert wird (Romer et al., 1994), sondern darüber hinaus bis zum 16. Tag. In den immunhistochemischen Analysen dieser Arbeit ist die Expression von uPAR in Keratinozyten der hyperplastischen Epidermis analog zu der Expression des MET-Rezeptors um den vierten Tag nach Verwundung am stärksten ausgeprägt und fällt anschließend wieder ab. Somit wurde eine zeitliche Überschneidung der Proteinbiosynthese von uPAR sowohl mit der Expression des MET-Rezeptors als auch mit der Bioverfügbarkeit von HGF in der Wundheilung bestätigt. Neben der zeitlichen Übereinstimmung fällt auch die Lokalisation der uPAR- und der MET-Expression zusammen, wobei sich die Expression beider Rezeptoren in der frühen Phase der Reepithelisierung (vierter Tag nach Verwundung) großflächig über die ‚migration-tongue‘ und die hyperplastische Epidermis erstreckt. Ab dem sechsten Tag werden uPAR und MET deutlich weniger von Keratinozyten des Stratum basale, granulosum und corneum exprimiert, vermutlich da die Keratinozyten dieser Schichten zu der Struktur und den Funktionen der unverwundeten Epidermis zurückkehren (Schäfer et al., 1995). Dabei

liegen die Rezeptoren hauptsächlich noch in suprabasalen, vitalen Keratinozyten vor, welche vermutlich am längsten aktiviert bleiben (Hertle et al., 1992).

Demzufolge werden MET und uPAR in der Wundheilung unter der Bioverfügbarkeit ihrer jeweiligen Liganden HGF und PA (Romer et al., 1991) von aktivierten, reepithelisierenden Keratinozyten insbesondere innerhalb der ‚migration tongue‘ koexprimiert. Dadurch ist ein maßgeblicher Einfluß von HGF unter der Beteiligung von uPAR auf die Bildung der ‚migration tongue‘ wahrscheinlich. Weiterhin werden in der Wundheilung die Reepithelisierung durch HGF (Yoshida et al., 2003) und die Fibrinolyse durch uPAR (Bugge et al., 1996) stimuliert, was ebenfalls auf eine zentrale Funktion von HGF unter der Mitwirkung von uPAR bei der Aktivierung und Migration der Keratinozyten hinweist. Darüber hinaus konnte in dieser Arbeit *in vitro* nachgewiesen werden, daß die uPAR-Expression in Keratinozyten durch HGF induziert werden kann und an der HGF-bedingten Stimulierung der Migration von Keratinozyten beteiligt ist. Im Gegensatz dazu stimulieren weder KGF noch GM-CSF die Migration von Keratinozyten unter der Mitwirkung von uPAR. Der potentiell zentrale Einfluß von HGF auf die Bildung der ‚migration tongue‘ unter der Beteiligung von uPAR könnte somit ein exklusiver Effekt dieses Zytokins sein, obwohl die Reepithelisierung im Wundheilungsprozeß neben HGF auch durch KGF (Werner et al., 1994) und GM-CSF (Mann et al., 2001) stimuliert werden kann.

Die hier in einem *in vitro* Wundheilungsmodell erhobenen Daten bestätigen, daß HGF in primären Keratinozyten Zielgene induziert, die einen bedeutenden Stellenwert bei der Induktion proliferativer, migratorischer und anti-apoptotischer Vorgänge haben. Am Beispiel von uPAR wurde die funktionelle Relevanz dieser HGF-abhängigen Genregulationen in Keratinozyten nachgewiesen und auf die *in vivo* Situation übertragen, wobei HGF unter der Beteiligung von uPAR wahrscheinlich insbesondere die Bildung der ‚migration tongue‘ stimuliert.

6 Zusammenfassung

HGF (*hepatocyte growth factor*) ist ein pleiotropes Zytokin, das in einer mesenchymal-epithelialen Interaktion an den transmembranen Rezeptor MET bindet. Infolgedieser Ligan-den-Rezeptor-Interaktion werden verschiedene Signalwege aktiviert, die in der Zielzelle so-wohl zu einer Stimulierung der Proliferation, Morphogenese, Angiogenese und Migration als auch zu einer Hemmung der Apoptose führen können. Das HGF/MET-Signaltransduktions-system beeinflußt somit Prozesse der Embryogenese und der Wundheilung verschiedener Organe einschließlich der Haut. In der kutanen Wundheilung sind die spezifischen molekula-ren Wirkungsmechanismen von HGF in Abgrenzung zu anderen Zytokinen bislang jedoch nicht verstanden. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluß von HGF im Vergleich zu ande-ren Wachstumsfaktoren (KGF und GM-CSF) auf das Expressionsmuster in Keratinozyten während der kutanen Wundheilung analysiert. Dafür wurde das heterologe *feeder-layer* Ko-kultur-Wundheilungsmodell aus humanen primären Keratinozyten und murinen c-jun^{-/-} Fibro-blasten eingesetzt, da es ermöglicht, die spezifischen Einflüsse dieser Zytokine auf das Ex-pressionsmuster von Keratinozyten unter Ausschluß von sekundären oder kompensatorischen Effekten miteinander zu vergleichen.

Mittels *GeneChip*[®] *Expression Array*-Analysen wurden sowohl gemeinsame als auch spezi-fische Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF identifiziert und deren Regulation exemplarisch an FRA1, CTGF, TNFAIP3, uPAR und K10 in der semiquantitativen *realtime* PCR bestä-tigt. Am Beispiel von uPAR konnte nachgewiesen werden, daß sich die zytokinabhängige mRNA-Syntheseregulation auch auf die Proteinbiosynthese auswirkt. Funktionelle Konse- quenzen der mRNA-Expressionsregulation von uPAR wurden *in vitro* ausschließlich bei der HGF-induzierten Migration durch einen Migrationstest mit neutralisierendem uPAR-Antikörper belegt. Darüber hinaus konnte in der murinen Wundheilung *in vivo* nachgewiesen werden, daß MET und uPAR in aktivierten Keratinozyten insbesondere innerhalb der *migra-tion tongue* bei gleichzeitiger Bioverfügbarkeit von HGF koexprimiert werden. Diese Ergeb-nisse legen eine maßgebliche und spezifische Funktion von HGF unter der Beteiligung von uPAR bei der Bildung der *migration tongue* nahe.

In dieser Arbeit wurde somit ein *in vivo* nahes System etabliert und verifiziert, mit dessen Hilfe der spezifische Einfluß von HGF und anderen wundheilungsrelevanten Zytokinen auf

die Expression von Zielgenen in primären Keratinozyten analysiert werden kann. Weiterhin konnte am Beispiel von uPAR gezeigt werden, daß die Expression der identifizierten Zielgene von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Wirkung von HGF in der kutanen Wundheilung ist.

7 Literatur

Andreadis ST, Hamoen KE, Yarmush ML, Morgan JR. (2001): Keratinocyte growth factor induces hyperproliferation and delays differentiation in a skin equivalent model system. *FASEB J* 15, 898-906.

Angel P, Szabowski A, Schorpp-Kistner M. (2001): Function and regulation of AP-1 subunits in skin physiology and pathology. *Oncogene* 20, 2413-23.

Angel P, Szabowski A. (2002): Function of AP-1 target genes in mesenchymal-epithelial cross-talk in skin. *Biochem Pharmacol* 64, 949-56.

auf dem Keller U, Krampert M, Kumin A, Braun S, Werner S. (2004): Keratinocyte growth factor: effects on keratinocytes and mechanisms of action. *Eur J Cell Biol.* 83, 607-12.

Bardelli A, Pugliese L, Comoglio PM. (1997): "Invasive-growth" signaling by the Met/HGF receptor: the hereditary renal carcinoma connection. *Biochim Biophys Acta.* 1333, M41-51.

Beilmann M, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P. (2000): Hepatocyte growth factor-stimulated invasiveness of monocytes. *Blood* 95, 3964-9.

Beilmann M, Odenthal M, Jung W, Vande Woude GF, Dienes HP, Schirmacher P. (1997): Neoexpression of the c-met/hepatocyte growth factor-scatter factor receptor gene in activated monocytes. *Blood* 90, 4450-8.

Bennett JH, Morgan MJ, Whawell SA, Atkin P, Roblin P, Furness J, Speight PM. (2000): Metalloproteinase expression in normal and malignant oral keratinocytes: stimulation of MMP-2 and -9 by scatter factor. *Eur J Oral Sci* 108, 281-91.

Bertotti A, Comoglio PM. (2003): Tyrosine kinase signal specificity: lessons from the HGF receptor. *Trends Biochem Sci* 28, 527-33.

Bevan D, Gherardi E, Fan TP, Edwards D, Warn R. (2004): Diverse and potent activities of HGF/SF in skin wound repair. *J Pathol* 20, 831-8.

Birchmeier C, Bladt F, Yamaai T. (1997): The functions of HGF/SF and its receptor, the c-Met tyrosine kinase, in mammalian development. *Ciba Found Symp* 212, 169-77; discussion 177-82.

Boccaccio C, Ando' M, Comoglio PM. (2002): A differentiation switch for genetically modified hepatocytes. *FASEB J* 16, 120-2.

Boon EM, Kovarikova M, Derksen PW, van der Neut R. (2005): MET signalling in primary colon epithelial cells leads to increased transformation irrespective of aberrant Wnt signalling. *Br J Cancer.* 92, 1078-83.

- Bradham DM, Igarashi A, Potter RL, Grotendorst GR. (1991): Connective tissue growth factor: a cysteine-rich mitogen secreted by human vascular endothelial cells is related to the SRC-induced immediate early gene product CEF-10. *J Cell Biol* 114, 1285-94.
- Breuhahn K, Mann A, Muller G, Wilhelmi A, Schirmacher P, Enk A, Blessing M. (2000): Epidermal overexpression of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces both keratinocyte proliferation and apoptosis. *Cell Growth Differ* 11, 111-21.
- Brinkmann V, Foroutan H, Sachs M, Weidner KM, Birchmeier W. (1995): Hepatocyte growth factor/scatter factor induces a variety of tissue-specific morphogenic programs in epithelial cells. *J Cell Biol* 131, 1573-86.
- Brown LF, Yeo KT, Berse B, Yeo TK, Senger DR, Dvorak HF, van de Water L. (1992): Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) by epidermal keratinocytes during wound healing. *J Exp Med* 176, 375-9.
- Bucher O, Wartenberg H. (1997): *Cytologie, Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen*. Verlag Hans Huber, Bern.
- Bugge TH, Flick MJ, Danton MJ, Daugherty CC, Romer J, Dano K, Carmeliet P, Collen D, Degen JL. (1996): Urokinase-type plasminogen activator is effective in fibrin clearance in the absence of its receptor or tissue-type plasminogen activator. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5899-904.
- Burch PM, Yuan Z, Loonen A, Heintz NH. An (2004): An extracellular signal-regulated kinase 1- and 2-dependent program of chromatin trafficking of c-Fos and Fra-1 is required for cyclin D1 expression during cell cycle reentry. *Mol Cell Biol* 24, 4696-709.
- Buth H, Wolters B, Hartwig B, Meier-Bornheim R, Veith H, Hansen M, Sommerhoff CP, Schaschke N, Machleidt W, Fusenig NE, Boukamp P, Brix K. (2004): HaCaT keratinocytes secrete lysosomal cysteine proteinases during migration. *Eur J Cell Biol* 83, 781-95.
- Castagnino P, Soriano JV, Montesano R, Bottaro DP. (1998): Induction of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 is a delayed early cellular response to hepatocyte growth factor. *Oncogene* 17, 481-92.
- Castellino FJ, Ploplis VA. (2005): Structure and function of the plasminogen/plasmin system. *Thromb Haemost* 93, 647-54.
- Catlow K, Deakin JA, Delehedde M, Fernig DG, Gallagher JT, Pavao MS, Lyon M. (2003): Hepatocyte growth factor/scatter factor and its interaction with heparan sulphate and dermatan sulphate. *Biochem Soc Trans* 31, 352-3.
- Chen Q, DeFrances MC, Zarnegar R. (1996): Induction of met proto-oncogene (hepatocyte growth factor receptor) expression during human monocyte-macrophage differentiation. *Cell Growth Differ* 7, 821-32.

- Chiara F, Michieli P, Pugliese L, Comoglio PM. (2003): Mutations in the met oncogene unveil a "dual switch" mechanism controlling tyrosine kinase activity. *J Biol Chem* 278, 29352-8.
- Cioce V, Csaky KG, Chan AM, Bottaro DP, Taylor WG, Jensen R, Aaronson SA, Rubin JS. (1996): Hepatocyte growth factor (HGF)/NK1 is a naturally occurring HGF/scatter factor variant with partial agonist/antagonist activity. *J Biol Chem* 271, 13110-5.
- Cowin AJ, Kallincos N, Hatzirodos N, Robertson JG, Pickering KJ, Couper J, Belford DA. (2001): Hepatocyte growth factor and macrophage-stimulating protein are upregulated during excisional wound repair in rats. *Cell Tissue Res* 306, 239-50.
- Daniel S, Arvelo MB, Patel VI, Longo CR, Shrikhande G, Shukri T, Mahiou J, Sun DW, Mottley C, Grey ST, Ferran C. (2004): A20 protects endothelial cells from TNF-, Fas-, and NK-mediated cell death by inhibiting caspase 8 activation. *Blood* 104, 2376-84.
- Daniels JT, Limb GA, Saarialho-Kere U, Murphy G, Khaw PT. (2003): Human corneal epithelial cells require MMP-1 for HGF-mediated migration on collagen I. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 44, 1048-55.
- Day RM, Cioce V, Breckenridge D, Castagnino P, Bottaro DP. (1999): Differential signaling by alternative HGF isoforms through c-Met: activation of both MAP kinase and PI 3-kinase pathways is insufficient for mitogenesis. *Oncogene* 18, 3399-406.
- Delehedde M, Lyon M, Vidyasagar R, McDonnell TJ, Fernig DG. (2002): Hepatocyte growth factor/scatter factor binds to small heparin-derived oligosaccharides and stimulates the proliferation of human HaCaT keratinocytes. *J Biol Chem* 277, 12456-62.
- Deleu S, Pirson I, Clermont F, Nakamura T, Dumont JE, Maenhaut C. (1999): Immediate early gene expression in dog thyrocytes in response to growth, proliferation, and differentiation stimuli. *J Cell Physiol* 18, 342-54.
- DeLongchamp RR, Bowyer JF, Chen JJ, Kodell RL. (2004): Multiple-testing strategy for analyzing cDNA array data on gene expression. *Biometrics* 60, 774-82.
- Desmouliere A, Redard M, Darby I, Gabbiani G. (1995): Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. *Am J Pathol* 146, 56-66.
- Deuel TF, Senior RM, Huang JS, Griffin GL. (1982): Chemotaxis of monocytes and neutrophils to platelet-derived growth factor. *J Clin Invest* 69, 1046-9.
- Devarajan P. (2004): Has HGF met other partners? Met-independent epithelial morphogenesis induced by HGF. Focus on "Hepatocyte growth factor induces MDCK cell morphogenesis without causing loss of tight junction functional integrity". *Am J Physiol Cell Physiol*. 286, C475-7.
- Dowrick P, Kenworthy P, McCann B, Warn R. (1993): Circular ruffle formation and closure lead to macropinocytosis in hepatocyte growth factor/scatter factor-treated cells. *Eur J Cell Biol* 6, 44-53.

- Dowrick PG, Prescott AR, Warn RM. (1991): Scatter factor affects major changes in the cytoskeletal organization of epithelial cells. *Cytokine* 3, 299-310.
- Dunsmore SE, Rubin JS, Kovacs SO, Chedid M, Parks WC, Welgus HG. (1996): Mechanisms of hepatocyte growth factor stimulation of keratinocyte metalloproteinase production. *J Biol Chem* 271, 24576-82.
- Eckes B, Aumailley M, Krieg T. (1996): Collagens and the reestablishment of dermal integrity. In: Clark RA Hg. (1996): *The molecular and cellular biology of wound repair*. Plenum Press. New York, USA. 493-512.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO and Botstein D. (1998): Cluster Analysis and Display of Genome-Wide Expression Patterns. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 14863-14868.
- Elliott BE, Hung WL, Boag AH, Tuck AB. (2002): The role of hepatocyte growth factor (scatter factor) in epithelial-mesenchymal transition and breast cancer. *Can J Physiol Pharmacol*. Feb 80, 91-102.
- Esther RJ, Lamps L, Schwartz HS. (1999): Marjolin ulcers: secondary carcinomas in chronic wounds. *J South Orthop Assoc*. Fall 8, 181-7.
- Ewens WJ, Grant GR. (2001): *Statistical Methods in Bioinformatics*. Grant Springer-Verlag, New York.
- Fan S, Ma YX, Wang JA, Yuan RQ, Meng Q, Cao Y, Laterra JJ, Goldberg ID, Rosen EM. (2000): The cytokine hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits apoptosis and enhances DNA repair by a common mechanism involving signaling through phosphatidyl inositol 3' kinase. *Oncogene* 19, 2212-23.
- Ferguson MW, O'Kane S. (2004): Scar-free healing: from embryonic mechanisms to adult therapeutic intervention. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 839-50.
- Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, Hillan KJ, Moore MW. (1996): Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature* 380, 439-42.
- Fiorini M, Ballaro C, Sala G, Falcone G, Alema S, Segatto O. (2002): Expression of RALT, a feedback inhibitor of ErbB receptors, is subjected to an integrated transcriptional and post-translational control. *Oncogene* 21, 6530-9.
- Follenzi A, Bakovic S, Gual P, Stella MC, Longati P, Comoglio PM. (2000): Cross-talk between the proto-oncogenes Met and Ron. *Oncogene* 19, 3041-9.
- Fujie T, Katoh S, Oura H, Urano Y, Arase S. (2001): The chemotactic effect of a dermal papilla cell-derived factor on outer root sheath cells. *J Dermatol Sci* 25, 206-12.
- Fujiuchi Y, Nagakawa O, Murakami K, Fuse H, Saiki I. (2003): Effect of hepatocyte growth factor on invasion of prostate cancer cell lines. *Oncol Rep* 10, 1001-6.

- Furuyama A, Mochitate K. (2004): Hepatocyte growth factor inhibits the formation of the basement membrane of alveolar epithelial cells in vitro. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 286, L939-46.
- Gailit J, Clark RA. (1994): Wound repair in the context of extracellular matrix. *Curr Opin Cell Biol* 6, 717-25.
- Gambarotta G, Boccaccio C, Giordano S, Ando M, Stella MC, Comoglio PM. (1996): Ets up-regulates MET transcription. *Oncogene* 13, 1911-7.
- Gerritsen ME, Tomlinson JE, Zlot C, Ziman M, Hwang S. (2003): Using gene expression profiling to identify the molecular basis of the synergistic actions of hepatocyte growth factor and vascular endothelial growth factor in human endothelial cells. *Br J Pharmacol* 140, 595-610.
- Gherardi E, Gray J, Stoker M, Perryman M, Furlong R. (1989): Purification of scatter factor, a fibroblast-derived basic protein that modulates epithelial interactions and movement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 5844-8.
- Gherardi E, Sharpe M, Lane K, Sirulnik A, Stoker M. (1993): Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF), the c-met receptor and the behaviour of epithelial cells. *Symp Soc Exp Biol* 47, 163-81.
- Gherardi E, Youles ME, Miguel RN, Blundell TL, Iamele L, Gough J, Bandyopadhyay A, Hartmann G, Butler PJ. (2003): Functional map and domain structure of MET, the product of the c-met protooncogene and receptor for hepatocyte growth factor/scatter factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 12039-44.
- Gille J, Khalik M, Konig V, Kaufmann R. (1998): Hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) induces vascular permeability factor (VPF/VEGF) expression by cultured keratinocytes. *J Invest Dermatol* 111, 1160-5.
- Giordano S, Corso S, Conrotto P, Artigiani S, Gilestro G, Barberis D, Tamagnone L, (2002): Comoglio PM. The semaphorin 4D receptor controls invasive growth by coupling with Met. *Nat Cell Biol* 4, 720-4.
- Giordano S, Di Renzo MF, Narsimhan RP, Cooper CS, Rosa C, Comoglio PM. (1989): Biosynthesis of the protein encoded by the c-met proto-oncogene. *Oncogene* 4, 1383-8.
- Giordano S, Maffe A, Williams TA, Artigiani S, Gual P, Bardelli A, Basilico C, Michieli P, Comoglio PM. (2000): Different point mutations in the met oncogene elicit distinct biological properties. *FASEB J* 14, 399-406.
- Gohda E, Kuromitsu K, Matsunaga T, Miyazaki M, Yamamoto I. (2000): Synergism between interferon-gamma and cAMP in induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts. *Cytokine* 12, 780-5.
- Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Biswas P, Centracchio JN, Dworkin LD. (2004): Hepatocyte growth factor ameliorates renal interstitial inflammation in rat remnant kidney by modulating

tubular expression of macrophage chemoattractant protein-1 and RANTES. *J Am Soc Nephrol* 15, 2868-81.

Gong R, Rifai A, Tolbert EM, Centracchio JN, Dworkin LD. (2003): Hepatocyte growth factor modulates matrix metalloproteinases and plasminogen activator/plasmin proteolytic pathways in progressive renal interstitial fibrosis. *J Am Soc Nephrol* 14, 3047-60.

Grenier A, Chollet-Martin S, Crestani B, Delarche C, El Benna J, Boutten A, Andrieu V, Durand G, Gougerot-Pocidalo MA, Aubier M, Dehoux M. (2002): Presence of a mobilizable intracellular pool of hepatocyte growth factor in human polymorphonuclear neutrophils. *Blood* 99, 2997-3004.

Gron B, Stoltze K, Andersson A, Dabelsteen E. (2002): Oral fibroblasts produce more HGF and KGF than skin fibroblasts in response to co-culture with keratinocytes. *APMIS* 110, 892-8.

Groves RW, Schmidt-Lucke JA. (2000): Recombinant human GM-CSF in the treatment of poorly healing wounds. *Adv Skin Wound Care* 13, 107-12.

Gual P, Giordano S, Williams TA, Rocchi S, Van Obberghen E, Comoglio PM. (2000): Sustained recruitment of phospholipase C-gamma to Gab1 is required for HGF-induced branching tubulogenesis. *Oncogene* 19, 1509-18.

Hall CL, Tsan R, Mugnai G, Mazar A, Radinsky R, Pettaway CA. (2004): Enhanced invasion of hormone refractory prostate cancer cells through hepatocyte growth factor (HGF) induction of urokinase-type plasminogen activator (u-PA). *Prostate* 59, 167-76.

Hartmann G, Naldini L, Weidner KM, Sachs M, Vigna E, Comoglio PM, Birchmeier W. (1992): A functional domain in the heavy chain of scatter factor/hepatocyte growth factor binds the c-Met receptor and induces cell dissociation but not mitogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 11574-8.

Hashigasako A, Machide M, Nakamura T, Matsumoto K, Nakamura T. (2004): Bi-directional regulation of Ser-985 phosphorylation of c-met via protein kinase C and protein phosphatase 2A involves c-Met activation and cellular responsiveness to hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 279, 26445-52.

Hertle MD, Kubler MD, Leigh IM, Watt FM. (1992): Aberrant integrin expression during epidermal wound healing and in psoriatic epidermis. *J Clin Invest* 89, 1892-901.

Hines MD, Allen-Hoffmann BL. (1996): Keratinocyte growth factor inhibits cross-linked envelope formation and nucleosomal fragmentation in cultured human keratinocytes. *J Biol Chem* 271, 6245-51.

Hiscox S, Jiang WG. (1999): Association of the HGF/SF receptor, c-met, with the cell-surface adhesion molecule, E-cadherin, and catenins in human tumor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 261, 406-11.

- Howdieshell TR, Callaway D, Webb WL, Gaines MD, Procter CD Jr, Sathyanarayana, Pollock JS, Brock TL, McNeil PL. (2001) Antibody neutralization of vascular endothelial growth factor inhibits wound granulation tissue formation. *J Surg Res* 96, 173-82.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. (2004): Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 4477-82.
- Husson H, Carideo EG, Neuberg D, Schultze J, Munoz O, Marks PW, Donovan JW, Chillemi AC, O'Connell P, Freedman AS. (2002): Gene expression profiling of follicular lymphoma and normal germinal center B cells using cDNA arrays. *Blood*. 99, 282-289.
- Hyuga S, Kawasaki N, Hyuga M, Ohta M, Shibayama R, Kawanishi T, Yamagata S, Yamagata T, Hayakawa T. (2001): Ganglioside GD1a inhibits HGF-induced motility and scattering of cancer cells through suppression of tyrosine phosphorylation of c-Met. *Int J Cancer* 94, 328-34.
- Ishizawa K, Kubo H, Yamada M, Kobayashi S, Suzuki T, Mizuno S, Nakamura T, Sasaki H. (2004): Hepatocyte growth factor induces angiogenesis in injured lungs through mobilizing endothelial progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* 324, 276-80.
- Ito W, Kanehiro A, Matsumoto K, Hirano A, Ono K, Maruyama H, Kataoka M, Nakamura T, Gelfand EW, Tanimoto M. (2005): Hepatocyte growth factor attenuates airway hyperresponsiveness, inflammation, and remodeling. *Am J Respir Cell Mol Biol* 32, 268-80.
- Iyengar P, Combs TP, Shah SJ, Gouon-Evans V, Pollard JW, Albanese C, Flanagan L, Tenniswood MP, Guha C, Lisanti MP, Pestell RG, Scherer PE. (2003): Adipocyte-secreted factors synergistically promote mammary tumorigenesis through induction of anti-apoptotic transcriptional programs and proto-oncogene stabilization. *Oncogene* 22, 6408-23.
- Jo M, Stolz DB, Esplen JE, Dorko K, Michalopoulos GK, Strom SC. (2000): Cross-talk between epidermal growth factor receptor and c-Met signal pathways in transformed cells. *J Biol Chem* 275, 8806-11.
- Johnson M, Kochhar K, Nakamura T, Iyer A. (1995): Hepatocyte growth factor-induced signal transduction in two normal mouse epithelial cell lines. *Biochem Mol Biol Int* 36, 465-74.
- Kadonaga, J.T., Carner, K.R., Masiarz, F.R. and Tjian, R. (1987) : Isolation of cDNA encoding transcription factor Sp1 and functional analysis of the DNA binding domain. *Cell* 51, 1079-1090.
- Kakazu A, Chandrasekhar G, Bazan HE. (2004): HGF protects corneal epithelial cells from apoptosis by the PI-3K/Akt-1/Bad- but not the ERK1/2-mediated signaling pathway. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 45, 3485-92.
- Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DR, Romero R, Messina A, Wagh M, Fraulin FO, Morrison WA, Stewart AG. (2001): Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. *Br J Pharmacol* 132, 1631-8.

- Kataoka H, Miyata S, Uchinokura S, Itoh H. (2003): Roles of hepatocyte growth factor (HGF) activator and HGF activator inhibitor in the pericellular activation of HGF/scatter factor. *Cancer Metastasis Rev* 22, 223-36.
- Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ. (2003): Protein kinase C controls microtubule-based traffic but not proteasomal degradation of c-Met. *J Biol Chem* 278, 28921-9.
- Kermorgant S, Zicha D, Parker PJ. (2004): PKC controls HGF-dependent c-Met traffic, signalling and cell migration. *EMBO J* 23, 3721-34.
- Kjoller L. (2002): The urokinase plasminogen activator receptor in the regulation of the actin cytoskeleton and cell motility. *Biol Chem* 383, 5-19.
- Komada M, Hatsuzawa K, Shibamoto S, Ito F, Nakayama K, Kitamura N. (1993): Proteolytic processing of the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor by furin. *FEBS Lett* 328, 25-9.
- Koyama S, Sato E, Tsukadaira A, Haniuda M, Numanami H, Kurai M, Nagai S, Izumi T. (2002): Vascular endothelial growth factor mRNA and protein expression in airway epithelial cell lines in vitro. *Eur Respir J* 20, 1449-56.
- Kramer MD, Schaefer B, Reinartz J. (1995): Plasminogen activation by human keratinocytes: molecular pathways and cell-biological consequences. *Biol Chem Hoppe Seyler* 376, 131-41.
- Kunisada T, Yamazaki H, Hirobe T, Kamei S, Omoteno M, Tagaya H, Hemmi H, Koshimizu U, Nakamura T, Hayashi SI. (2000): Keratinocyte expression of transgenic hepatocyte growth factor affects melanocyte development, leading to dermal melanocytosis. *Mech Dev* 94, 67-78.
- Kurz SM, Diebold SS, Hieronymus T, Gust TC, Bartunek P, Sachs M, Birchmeier W, Zenke M. (2002): The impact of c-met/scatter factor receptor on dendritic cell migration. *Eur J Immunol* 32, 1832-8.
- Leask A, Holmes A, Black CM, Abraham DJ. (2003): Connective tissue growth factor gene regulation. Requirements for its induction by transforming growth factor-beta 2 in fibroblasts. *J Biol Chem* 278, 13008-15
- Leibovich SJ, Ross R. (1975): The role of the macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and antimacrophage serum. *Am J Pathol* 78, 71-100.
- Li C, Hung Wong W. (2001): Model-based analysis of oligonucleotide arrays: model validation, design issues and standard error application. *Genome Biol* 2, RESEARCH0032.
- Li C, Hung Wong W. (2003): DNA-Chip Analyzer (dChip). In: Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry R, Zeger SL, Hg. (2003): The analysis of gene expression data: methods and software. Springer-Verlag, New York.

Li G, Gustafson-Brown C, Hanks SK, Nason K, Arbeit JM, Pogliano K, Wisdom RM, Johnson RS. (2003): c-Jun is essential for organization of the epidermal leading edge. *Dev Cell* 4, 865-77.

Li G, Schaidler H, Satyamoorthy K, Hanakawa Y, Hashimoto K, Herlyn M. (2001): Downregulation of E-cadherin and Desmoglein 1 by autocrine hepatocyte growth factor during melanoma development. *Oncogene* 20, 8125-35.

Liang Q, Mohan RR, Chen L, Wilson SE. (1998): Signaling by HGF and KGF in corneal epithelial cells: Ras/MAP kinase and Jak-STAT pathways. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39, 1329-38.

Lindner G, Menrad A, Gherardi E, Merlino G, Welker P, Handjiski B, Roloff B, Paus R. (2000): Involvement of hepatocyte growth factor/scatter factor and met receptor signaling in hair follicle morphogenesis and cycling. *FASEB J* 14, 319-32.

Liu ZX, Yu CF, Nickel C, Thomas S, Cantley LG. (2002): Hepatocyte growth factor induces ERK-dependent paxillin phosphorylation and regulates paxillin-focal adhesion kinase association. *J Biol Chem* 277, 10452-8.

Longati P, Bardelli A, Ponzetto C, Naldini L, Comoglio PM. (1994): Tyrosines1234-1235 are critical for activation of the tyrosine kinase encoded by the MET proto-oncogene (HGF receptor). *Oncogene.* 9, 49-57.

Maas-Szabowski N, Szabowski A, Stark HJ, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Angel P, Fusenig NE. (2001): Organotypic cocultures with genetically modified mouse fibroblasts as a tool to dissect molecular mechanisms regulating keratinocyte growth and differentiation. *J Invest Dermatol* 116, 816-20.

Madlener M, Mauch C, Conca W, Brauchle M, Parks WC, Werner S. (1996): Regulation of the expression of stromelysin-2 by growth factors in keratinocytes: implications for normal and impaired wound healing. *Biochem J* 320, 659-64.

Makela M, Larjava H, Pirila E, Maisi P, Salo T, Sorsa T, Uitto VJ. (1999): Matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) is related to migration of keratinocytes. *Exp Cell Res* 251, 67-78.

Mann A, Breuhahn K, Schirmacher P, Blessing M. (2001): Keratinocyte-derived granulocyte-macrophage colony stimulating factor accelerates wound healing: Stimulation of keratinocyte proliferation, granulation tissue formation, and vascularization. *J Invest Dermatol* 117, 1382-90.

Mark MR, Lokker NA, Zioncheck TF, Luis EA, Godowski PJ. (1992): Expression and characterization of hepatocyte growth factor receptor-IgG fusion proteins. Effects of mutations in the potential proteolytic cleavage site on processing and ligand binding. *J Biol Chem* 267, 26166-71.

Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. (1993): Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143, 949-58.

- Martin P. (1997): Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
- Matsui M, Tokuhara M, Konuma Y, Nomura N, Ishizaki R. (1990): Isolation of human fos-related genes and their expression during monocyte-macrophage differentiation. *Oncogene* 5, 249-55.
- Matsumoto K, Date K, Ohmichi H, Nakamura T. (1996): Hepatocyte growth factor in lung morphogenesis and tumor invasion: role as a mediator in epithelium-mesenchyme and tumor-stroma interactions. *Cancer Chemother Pharmacol* 38 Suppl, S42-7.
- Matsumoto K, Hashimoto K, Yoshikawa K, Nakamura T. (1991): Marked stimulation of growth and motility of human keratinocytes by hepatocyte growth factor. *Exp Cell Res* 196, 114-20.
- Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T. (1992): Up-regulation of hepatocyte growth factor gene expression by interleukin-1 in human skin fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 188, 235-43.
- Matsumoto K, Okazaki H, Nakamura T. (1995): Novel function of prostaglandins as inducers of gene expression of HGF and putative mediators of tissue regeneration. *J Biochem (Tokyo)* 117, 458-64.
- Mazar AP, Henkin J, Goldfarb RH. (1999): The urokinase plasminogen activator system in cancer: implications for tumor angiogenesis and metastasis. *Angiogenesis* 3, 15-32.
- McCawley LJ, O'Brien P, Hudson LG. (1998): Epidermal growth factor (EGF)- and scatter factor/hepatocyte growth factor (SF/HGF)- mediated keratinocyte migration is coincident with induction of matrix metalloproteinase (MMP)-9. *J Cell Physiol* 176, 255-65.
- McClain SA, Simon M, Jones E, Nandi A, Gailit JO, Tonnesen MG, Newman D, Clark RA. (1996): Mesenchymal cell activation is the rate-limiting step of granulation tissue induction. *Am J Pathol* 149, 1257-70.
- McGowan K, Coulombe PA. (1998): The wound repair-associated keratins 6, 16, and 17. Insights into the role of intermediate filaments in specifying keratinocyte cytoarchitecture. *Subcell Biochem* 31, 173-204.
- Mesaeli N, Phillipson C. (2004): Impaired p53 expression, function, and nuclear localization in calreticulin-deficient cells. *Mol Biol Cell* 15, 1862-70.
- Michieli P, Cavassa S, Basilico C, De Luca A, Mazzone M, Asti C, Chiusaroli R, Guglielmi M, Bossu P, Colotta F, Caselli G, Comoglio PM. (2002): An HGF-MSP chimera disassociates the trophic properties of scatter factors from their pro-invasive activity. *Nat Biotechnol* 20, 488-95.
- Michieli P, Mazzone M, Basilico C, Cavassa S, Sottile A, Naldini L, Comoglio PM. (2004): Targeting the tumor and its microenvironment by a dual-function decoy Met receptor. *Cancer Cell* 6, 61-73.

- Milde-Langosch K, Roder H, Andritzky B, Aslan B, Hemminger G, Brinkmann A, Bamberger CM, Loning T, Bamberger AM. (2004): The role of the AP-1 transcription factors c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2 in the invasion process of mammary carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 86, 139-52.
- Mildner M, Eckhart L, Lengauer B, Tschachler E. (1999): Hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits UVB induced apoptosis of human keratinocytes via the PI-3-kinase pathway. *J Invest Dermatol* 113, 1136-7.
- Mildner M, Eckhart L, Lengauer B, Tschachler E. (2002): Hepatocyte growth factor/scatter factor inhibits UVB-induced apoptosis of human keratinocytes but not of keratinocyte-derived cell lines via the phosphatidylinositol 3-kinase/AKT pathway. *J Biol Chem* 277, 14146-52.
- Miura Y, Kozuki Y, Yagasaki K. (2003): Potentiation of invasive activity of hepatoma cells by reactive oxygen species is mediated by autocrine/paracrine loop of hepatocyte growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 23, 160-5.
- Miyazawa K, Shimomura T, Naka D, Kitamura N. (1994): Proteolytic activation of hepatocyte growth factor in response to tissue injury. *J Biol Chem* 269, 8966-70.
- Mizuno K, Inoue H, Hagiya M, Shimizu S, Nose T, Shimohigashi Y, Nakamura T. (1994): Hairpin loop and second kringle domain are essential sites for heparin binding and biological activity of hepatocyte growth factor. *J Biol Chem* 269, 1131-6.
- Moghul A, Lin L, Beedle A, Kanbour-Shakir A, DeFrances MC, Liu Y, Zarnegar R. (1994): Modulation of c-MET proto-oncogene (HGF receptor) mRNA abundance by cytokines and hormones: evidence for rapid decay of the 8 kb c-MET transcript. *Oncogene* 9, 2045-52.
- Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. (1982): The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell* 31, 11-24.
- Monga SP, Mars WM, Pediaditakis P, Bell A, Mule K, Bowen WC, Wang X, Zarnegar R, Michalopoulos GK. (2002): Hepatocyte growth factor induces Wnt-independent nuclear translocation of beta-catenin after Met-beta-catenin dissociation in hepatocytes. *Cancer Res* 62, 2064-71.
- Montesano R, Matsumoto K, Nakamura T, Orci L. (1991): Identification of a fibroblast-derived epithelial morphogen as hepatocyte growth factor. *Cell* 67, 901-8.
- Moorby CD, Stoker M, Gherardi E. (1995): HGF/SF inhibits junctional communication. *Exp Cell Res* 219, 657-63.
- Mori S, Matsuzaki K, Yoshida K, Furukawa F, Tahashi Y, Yamagata H, Sekimoto G, Seki T, Matsui H, Nishizawa M, Fujisawa J, Okazaki K. (2004): TGF-beta and HGF transmit the signals through JNK-dependent Smad2/3 phosphorylation at the linker regions. *Oncogene* 23, 7416-29.

- Mori T, Shimizu A, Masuda Y, Fukuda Y, Yamanaka N. (2003): Hepatocyte growth factor-stimulating endothelial cell growth and accelerating glomerular capillary repair in experimental progressive glomerulonephritis. *Nephron Exp Nephrol* 94, e44-54.
- Moriyama T, Kataoka H, Hamasuna R, Yoshida E, Sameshima T, Iseda T, Yokogami K, Nakano S, Kono M, Wakisaka S. (1999): Simultaneous up-regulation of urokinase-type plasminogen activator (uPA) and uPA receptor by hepatocyte growth factor/scatter factor in human glioma cells. *Clin Exp Metastasis* 17, 873-9.
- Müller M, Morotti A, Ponzetto C. (2002): Activation of NF-kappaB is essential for hepatocyte growth factor-mediated proliferation and tubulogenesis. *Mol Cell Biol* 22, 1060-72.
- Müller MM, Fusenig NE. (1999): Constitutive expression of G-CSF and GM-CSF in human skin carcinoma cells with functional consequence for tumor progression. *Int J Cancer* 83, 780-789.
- Murphy G, Stanton H, Cowell S, Butler G, Knauper V, Atkinson S, Gavrilovic J. (1999): Mechanisms for pro matrix metalloproteinase activation. *APMIS* 107, 38-44.
- Nakagami H, Morishita R, Yamamoto K, Taniyama Y, Aoki M, Yamasaki K, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. (2002): Hepatocyte growth factor prevents endothelial cell death through inhibition of bax translocation from cytosol to mitochondrial membrane. *Diabetes* 51, 2604-11.
- Nakamura T, Nawa K, Ichihara A, Kaise N, Nishino T. (1987): Purification and subunit structure of hepatocyte growth factor from rat platelets. *FEBS Lett* 224, 311-6.
- Nakamura T, Nishizawa T, Hagiya M, Seki T, Shimonishi M, Sugimura A, Tashiro K, Shimizu S. (1989): Molecular cloning and expression of human hepatocyte growth factor. *Nature* 342, 440-3.
- Nakamura T. (1991) Structure and function of hepatocyte growth factor. *Prog Growth Factor* 3, 67-85.
- Nakanishi K, Uenoyama M, Tomita N, Morishita R, Kaneda Y, Ogihara T, Matsumoto K, Nakamura T, Maruta A, Matsuyama S, Kawai T, Aurues T, Hayashi T, Ikeda T. (2002): Gene transfer of human hepatocyte growth factor into rat skin wounds mediated by liposomes coated with the sendai virus (hemagglutinating virus of Japan). *Am J Pathol* 161, 1761-72.
- Naldini L, Vigna E, Bardelli A, Follenzi A, Galimi F, Comoglio PM. (1995): Biological activation of pro-HGF (hepatocyte growth factor) by urokinase is controlled by a stoichiometric reaction. *J Biol Chem* 270, 603-11.
- Nayeri F, Olsson H, Peterson C, Sundqvist T. (2005): Hepatocyte growth factor; expression, concentration and biological activity in chronic leg ulcers. *J Dermatol Sci* 37, 75-85.

- Nayeri F, Stromberg T, Larsson M, Brudin L, Soderstrom C, Forsberg P. (2002): Hepatocyte growth factor may accelerate healing in chronic leg ulcers: a pilot study. *J Dermatolog Treat* 13, 81-6.
- Okada M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Kagami K, Kawasaki K, Nakazawa S. (2004): Hepatocyte growth factor protects small airway epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor-alpha or oxidative stress. *Pediatr Res* 56, 336-44.
- Okigaki M, Komada M, Uehara Y, Miyazawa K, Kitamura N. (1992): Functional characterization of human hepatocyte growth factor mutants obtained by deletion of structural domains. *Biochemistry* 31, 9555-61.
- Oksala O, Salo T, Tammi R, Hakkinen L, Jalkanen M, Inki P, Larjava H. (1995): Expression of proteoglycans and hyaluronan during wound healing. *J Histochem Cytochem* 43, 125-35.
- Ono I, Yamashita T, Hida T, Jin HY, Ito Y, Hamada H, Akasaka Y, Ishii T, Jimbow K. (2004): Local administration of hepatocyte growth factor gene enhances the regeneration of dermis in acute incisional wounds. *J Surg Res* 120, 47-55.
- Opiari AW Jr, Boguski MS, Dixit VM. (1990): The A20 cDNA induced by tumor necrosis factor alpha encodes a novel type of zinc finger protein. *J Biol Chem* 265, 14705-8.
- Orian-Rousseau V, Chen L, Sleeman JP, Herrlich P, Ponta H. (2002): CD44 is required for two consecutive steps in HGF/c-Met signaling. *Genes Dev* 16, 3074-86.
- Ossowski L, Aguirre-Ghiso JA. (2000): Urokinase receptor and integrin partnership: coordination of signaling for cell adhesion, migration and growth. *Curr Opin Cell Biol* 12, 613-20.
- Otsuka T, Jakubczak J, Vieira W, Bottaro DP, Breckenridge D, Larochelle WJ, Merlino G. (2000): Disassociation of met-mediated biological responses in vivo: the natural hepatocyte growth factor/scatter factor splice variant NK2 antagonizes growth but facilitates metastasis. *Mol Cell Biol* 20, 2055-65.
- Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL. (2001): Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. *Mol Cell Biol* 21, 7449-59.
- Park M, Dean M, Kaul K, Braun MJ, Gonda MA, Vande Woude G. (1987): Sequence of MET protooncogene cDNA has features characteristic of the tyrosine kinase family of growth-factor receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84, 6379-83.
- Paumelle R, Tulasne D, Kherrouche Z, Plaza S, Leroy C, Reveneau S, Vandembunder B, Fafeur V. (2002): Hepatocyte growth factor/scatter factor activates the ETS1 transcription factor by a RAS-RAF-MEK-ERK signaling pathway. *Oncogene* 21, 2309-19. Erratum in: *Oncogene* (2002): 21, 4872. Tulashe, David [corrected to Tulasne, David]; Reveneau, Syline [corrected to Reveneau, Sylvie].

- Pediaditakis P, Monga SP, Mars WM, Michalopoulos GK. (2002): Differential mitogenic effects of single chain hepatocyte growth factor (HGF)/scatter factor and HGF/NK1 following cleavage by factor Xa. *J Biol Chem* 277, 14109-15.
- Peek M, Moran P, Mendoza N, Wickramasinghe D, Kirchhofer D. (2002): Unusual proteolytic activation of pro-hepatocyte growth factor by plasma kallikrein and coagulation factor XIa. *J Biol Chem* 277, 47804-9.
- Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. (2003): Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3, 347-61.
- Petrelli A, Gilestro GF, Lanzardo S, Comoglio PM, Migone N, Giordano S. (2002): The endophilin-CIN85-Cbl complex mediates ligand-dependent downregulation of c-Met. *Nature* 416, 187-90.
- Phaneuf D, Moscioni AD, LeClair C, Raper SE, Wilson JM. (2004): Generation of a mouse expressing a conditional knockout of the hepatocyte growth factor gene: demonstration of impaired liver regeneration. *DNA Cell Biol* 23, 592-603.
- Pilcher BK, Wang M, Qin XJ, Parks WC, Senior RM, Welgus HG. (1999): Role of matrix metalloproteinases and their inhibition in cutaneous wound healing and allergic contact hypersensitivity. *Ann N Y Acad Sci* 878, 12-24.
- Planz B, Wang Q, Kirley SD, Marberger M, McDougal WS. (2001): Regulation of keratinocyte growth factor receptor and androgen receptor in epithelial cells of the human prostate. *J Urol*. Aug 166, 678-83.
- Ponzetto C, Bardelli A, Maina F, Longati P, Panayotou G, Dhand R, Waterfield MD, Comoglio PM. (1993): A novel recognition motif for phosphatidylinositol 3-kinase binding mediates its association with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *Mol Cell Biol* 13, 4600-8.
- Ponzetto C, Bardelli A, Zhen Z, Maina F, dalla Zonca P, Giordano S, Graziani A, Panayotou G, Comoglio PM. (1994): A multifunctional docking site mediates signaling and transformation by the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor family. *Cell* 77, 261-71.
- Potempa S, Ridley AJ. (1998): Activation of both MAP kinase and phosphatidylinositide 3-kinase by Ras is required for hepatocyte growth factor/scatter factor-induced adherens junction disassembly. *Mol Biol Cell* 9, 2185-200.
- Prat M, Crepaldi T, Pennacchietti S, Bussolino F, Comoglio PM. (1998): Agonistic monoclonal antibodies against the Met receptor dissect the biological responses to HGF. *J Cell Sci* 111, 237-47.
- Rahimi N, Hung W, Tremblay E, Saulnier R, Elliott B. (1998): c-Src kinase activity is required for hepatocyte growth factor-induced motility and anchorage-independent growth of mammary carcinoma cells. *J Biol Chem* 273, 33714-21.

- Recio JA, Merlino G. (2002): Hepatocyte growth factor/scatter factor activates proliferation in melanoma cells through p38 MAPK, ATF-2 and cyclin D1. *Oncogene* 21, 1000-8.
- Reichelt J, Magin TM. (2002): Hyperproliferation, induction of c-Myc and 14-3-3sigma, but no cell fragility in keratin-10-null mice. *J Cell Sci* 115, 2639-50.
- Reinartz J, Link J, Todd RF, Kramer MD. (1994): The receptor for urokinase-type plasminogen activator of a human keratinocyte line (HaCaT). *Exp Cell Res* 214, 486-98.
- Reisinger K, Kaufmann R, Gille J. (2003): Increased Sp1 phosphorylation as a mechanism of hepatocyte growth factor (HGF/SF)-induced vascular endothelial growth factor (VEGF/VPF) transcription. *J Cell Sci* 116, 225-38.
- Ridley AJ, Comoglio PM, Hall A. (1995): Regulation of scatter factor/hepatocyte growth factor responses by Ras, Rac, and Rho in MDCK cells. *Mol Cell Biol* 15, 1110-22.
- Ried S, Jager C, Jeffers M, Vande Woude GF, Graeff H, Schmitt M, Lengyel E. R (1999): Activation mechanisms of the urokinase-type plasminogen activator promoter by hepatocyte growth factor/scatter factor. *J Biol Chem* 274, 16377-86.
- Rodrigues GA, Park M, Schlessinger J. (1997): Activation of the JNK pathway is essential for transformation by the Met oncogene. *EMBO J* 16, 2634-45.
- Romer J, Bugge TH, Pyke C, Lund LR, Flick MJ, Degen JL, Dano K. (1996): Impaired wound healing in mice with a disrupted plasminogen gene. *Nat Med* 2, 287-92.
- Romer J, Lund LR, Eriksen J, Pyke C, Kristensen P, Dano K. (1994): The receptor for urokinase-type plasminogen activator is expressed by keratinocytes at the leading edge during re-epithelialization of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 102, 519-22.
- Romer J, Lund LR, Eriksen J, Ralfkiaer E, Zeheb R, Gelehrter TD, Dano K, Kristensen P. (1991): Differential expression of urokinase-type plasminogen activator and its type-1 inhibitor during healing of mouse skin wounds. *J Invest Dermatol* 97, 803-11.
- Rosen EM, Grant DS, Kleinman HK, Goldberg ID, Bhargava MM, Nickoloff BJ, Kinsella JL, Polverini P. (1993): Scatter factor (hepatocyte growth factor) is a potent angiogenesis factor in vivo. *Symp Soc Exp Biol* 47, 227-34.
- Rosen EM, Nigam SK, Goldberg ID. (1994): Scatter factor and the c-met receptor: a paradigm for mesenchymal/epithelial interaction. *J Cell Biol* 127, 1783-7.
- Royal I, Fournier TM, Park M. (1997): Differential requirement of Grb2 and PI3-kinase in HGF/SF-induced cell motility and tubulogenesis. *J Cell Physiol* 173, 196-201.
- Royal I, Lamarche-Vane N, Lamorte L, Kaibuchi K, Park M. (2000): Activation of cdc42, rac, PAK, and rho-kinase in response to hepatocyte growth factor differentially regulates epithelial cell colony spreading and dissociation. *Mol Biol Cell* 11, 1709-25.

- Rubin JS, Day RM, Breckenridge D, Atabey N, Taylor WG, Stahl SJ, Wingfield PT, Kaufman JD, Schwall R, Bottaro DP. (2001): Dissociation of heparan sulfate and receptor binding domains of hepatocyte growth factor reveals that heparan sulfate-c-met interaction facilitates signaling. *J Biol Chem* 276, 32977-83.
- Saitoh K, Takahashi H, Sawada N, Parsons PG. (1994): Detection of the c-met proto-oncogene product in normal skin and tumours of melanocytic origin. *J Pathol* 174, 191-9.
- Sakamaki Y, Matsumoto K, Mizuno S, Miyoshi S, Matsuda H, Nakamura T. (2002): Hepatocyte growth factor stimulates proliferation of respiratory epithelial cells during postpneumectomy compensatory lung growth in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol* 26, 525-33.
- Sato C, Tsuboi R, Shi CM, Rubin JS, Ogawa H. (1995): Comparative study of hepatocyte growth factor/scatter factor and keratinocyte growth factor effects on human keratinocytes. *J Invest Dermatol* 104, 958-63.
- Scarpino S, Cancellario d'Alena F, Di Napoli A, Pasquini A, Marzullo A, Ruco LP. (2004): Increased expression of Met protein is associated with up-regulation of hypoxia inducible factor-1 (HIF-1) in tumour cells in papillary carcinoma of the thyroid. *J Pathol* 202, 352-8.
- Schadt EE, Li C, Su C, Hung Wong W. (2000): Analyzing high-density oligonucleotide gene expression array data. *Journal of Cellular Biochemistry* 80, 192-202.
- Schäfer BM, Stark HJ, Fusenig NE, Todd RF 3rd, Kramer MD. (1995): Differential expression of urokinase-type plasminogen activator (uPA), its receptor (uPA-R), and inhibitor type-2 (PAI-2) during differentiation of keratinocytes in an organotypic coculture system. *Exp Cell Res* 220, 415-23.
- Schäffer M, Becker H.-D. (1999): Immunregulation der Wundheilung. *Der Chirurg* 70, 897-908.
- Schäper U, Gehring NH, Fuchs KP, Sachs M, Kempkes B, Birchmeier W. (2000): Coupling of Gab1 to c-Met, Grb2, and Shp2 mediates biological responses. *J Cell Biol* 149, 1419-32.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, Gherardi E, Birchmeier C. (1995): Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 373, 699-702.
- Schorpp-Kistner M, Wang ZQ, Angel P, Wagner EF. (1999): JunB is essential for mammalian placentation. *EMBO J.* 18, 934-948.
- Schwartz MA, Ginsberg MH. (2002): Networks and crosstalk: integrin signalling spreads. *Nat Cell Biol* 4, E65-8.
- Sengupta S, Gherardi E, Sellers LA, Wood JM, Sasisekharan R, Fan TP. (2003): Hepatocyte growth factor/scatter factor can induce angiogenesis independently of vascular endothelial growth factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 69-75.

- Seol DW, Chen Q, Smith ML, Zarnegar R. (1999): Regulation of the c-met proto-oncogene promoter by p53. *J Biol Chem* 274, 3565-72.
- Seol DW, Chen Q, Zarnegar R. (2000): Transcriptional activation of the hepatocyte growth factor receptor (c-met) gene by its ligand (hepatocyte growth factor) is mediated through AP-1. *Oncogene* 19, 1132-7.
- Sharma GD, He J, Bazan HE. (2003): p38 and ERK1/2 coordinate cellular migration and proliferation in epithelial wound healing: evidence of cross-talk activation between MAP kinase cascades. *J Biol Chem* 278, 21989-97.
- Shephard P, Hinz B, Smola-Hess S, Meister JJ, Krieg T, Smola H. (2004): Dissecting the roles of endothelin, TGF-beta and GM-CSF on myofibroblast differentiation by keratinocytes. *Thromb Haemost* 92, 262-74.
- Shimaoka S, Tsuboi R, Jindo T, Imai R, Takamori K, Rubin JS, Ogawa H. (1995): Hepatocyte growth factor/scatter factor expressed in follicular papilla cells stimulates human hair growth in vitro. *J Cell Physiol* 165, 333-8.
- Shimomura T, Miyazawa K, Komiyama Y, Hiraoka H, Naka D, Morimoto Y, Kitamura N. (1995): Activation of hepatocyte growth factor by two homologous proteases, blood-coagulation factor XIIa and hepatocyte growth factor activator. *Eur J Biochem* 229, 257-61.
- Shin EY, Ma EK, Kim CK, Kwak SJ, Kim EG. (2002): Src/ERK but not phospholipase D is involved in keratinocyte growth factor-stimulated secretion of matrix metalloprotease-9 and urokinase-type plasminogen activator in SNU-16 human stomach cancer cell. *J Cancer Res Clin Oncol* 128, 596-602.
- Singer AJ, Clark RA. (1999): Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341, 738-46.
- Sivko GS, Sanford DC, Dearth LD, Tang D, DeWille JW. (2004): CCAAT/Enhancer binding protein delta (c/EBPdelta) regulation and expression in human mammary epithelial cells: II. Analysis of activating signal transduction pathways, transcriptional, post-transcriptional, and post-translational control. *J Cell Biochem* 93, 844-56.
- Smola H, Thiekotter G, Fusenig NE. (1993): Mutual induction of growth factor gene expression by epidermal-dermal cell interaction. *J Cell Biol* 122, 417-29.
- Sponsel HT, Breckon R, Hammond W, Anderson RJ. (1994): Mechanisms of recovery from mechanical injury of renal tubular epithelial cells. *Am J Physiol* 267, F257-64.
- Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C. (2004): Crystal structure of the HGF beta-chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J* 23, 2325-35.
- Stefan M, Koch A, Mancini A, Mohr A, Weidner KM, Niemann H, Tamura T. (2001): Src homology 2-containing inositol 5-phosphatase 1 binds to the multifunctional docking site of c-Met and potentiates hepatocyte growth factor-induced branching tubulogenesis. *J Biol Chem* 276, 3017-23.

Stoker M, Gherardi E, Perryman M, Gray J. (1987): Scatter factor is a fibroblast-derived modulator of epithelial cell mobility. *Nature* 327, 239-42.

Stoker M, Perryman M. (1985): An epithelial scatter factor released by embryo fibroblasts. *J Cell Sci* 77, 209-23.

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P. (2000): c-Jun and JunB antagonistically control cytokine-regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *Cell* 103, 745-55.

Tacchini L, De Ponti C, Matteucci E, Follis R, Desiderio MA. (2004): Hepatocyte growth factor-activated NF-kappaB regulates HIF-1 activity and ODC expression, implicated in survival, differently in different carcinoma cell lines. *Carcinogenesis* 25, 2089-100.

Takami Y, Motoki T, Yamamoto I, Gohda E. (2005): Synergistic induction of hepatocyte growth factor in human skin fibroblasts by the inflammatory cytokines interleukin-1 and interferon-gamma. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 212-7.

Tanimura S, Nomura K, Ozaki K, Tsujimoto M, Kondo T, Kohno M. (2002): Prolonged nuclear retention of activated extracellular signal-regulated kinase 1/2 is required for hepatocyte growth factor-induced cell motility. *J Biol Chem* 277, 28256-64.

Thomas S. (2002): Platelet membrane glycoproteins in haemostasis. *Clin Lab* 48, 247-62.

Tkach V, Tulchinsky E, Lukanidin E, Vinson C, Bock E, Berezin V. (2003): Role of the Fos family members, c-Fos, Fra-1 and Fra-2, in the regulation of cell motility. *Oncogene* 22, 5045-54.

Tokumaru S, Sayama K, Yamasaki K, Shirakata Y, Hanakawa Y, Yahata Y, Dai X, Tohyama M, Yang L, Yoshimura A, Hashimoto K. (2005): SOCS3/CIS3 negative regulation of STAT3 in HGF-induced keratinocyte migration. *Biochem Biophys Res Commun* 327, 100-5.

Tomita N, Morishita R, Taniyama Y, Koike H, Aoki M, Shimizu H, Matsumoto K, Nakamura T, Kaneda Y, Ogihara T. (2003): Angiogenic property of hepatocyte growth factor is dependent on upregulation of essential transcription factor for angiogenesis, ets-1. *Circulation* 107, 1411-7.

Toyoda M, Takayama H, Horiguchi N, Otsuka T, Fukusato T, Merlino G, Takagi H, Mori M. (2001): Overexpression of hepatocyte growth factor/scatter factor promotes vascularization and granulation tissue formation in vivo. *FEBS Lett* 509, 95-100.

Tsuboi R, Sato C, Shi CM, Ogawa H. (1992): Stimulation of keratinocyte migration by growth factors. *J Dermatol* 19, 652-3.

Uehara Y, Minowa O, Mori C, Shiota K, Kuno J, Noda T, Kitamura N. (1995): Placental defect and embryonic lethality in mice lacking hepatocyte growth factor/scatter factor. *Nature* 373, 702-5.

- Uitto VJ, Baillie D, Wu Q, Gendron R, Grenier D, Putnins EE, Kanervo A, Firth JD. (2005): *Fusobacterium nucleatum* increases collagenase 3 production and migration of epithelial cells. *Infect Immun* 73, 1171-9.
- van der Voort R, Taher TE, Wielenga VJ, Spaargaren M, Prevo R, Smit L, David G, Hartmann G, Gherardi E, Pals ST. (1999): Heparan sulfate-modified CD44 promotes hepatocyte growth factor/scatter factor-induced signal transduction through the receptor tyrosine kinase c-Met. *J Biol Chem* 274, 6499-506.
- Vargas GA, Hoeflich A, Jehle PM. (2000): Hepatocyte growth factor in renal failure: promise and reality. *Kidney Int* 57, 1426-36.
- Villa-Moruzzi E, Lapi S, Prat M, Gaudino G, Comoglio PM. (1993): A protein tyrosine phosphatase activity associated with the hepatocyte growth factor/scatter factor receptor. *J Biol Chem* 268, 18176-80.
- Wang X, DeFrances MC, Dai Y, Pediaditakis P, Johnson C, Bell A, Michalopoulos GK, Zarnegar R. (2002): A mechanism of cell survival: sequestration of Fas by the HGF receptor Met. *Mol Cell* 9, 411-21.
- Wasenius VM, Hemmer S, Kettunen E, Knuutila S, Franssila K, Joensuu H. (2003): Hepatocyte growth factor receptor, matrix metalloproteinase-11, tissue inhibitor of metalloproteinase-1, and fibronectin are up-regulated in papillary thyroid carcinoma: a cDNA and tissue microarray study. *Clin Cancer Res* 9, 68-75.
- Weidner KM, Sachs M, Birchmeier W. (1993): The Met receptor tyrosine kinase transduces motility, proliferation, and morphogenic signals of scatter factor/hepatocyte growth factor in epithelial cells. *J Cell Biol* 121, 145-54.
- Werner S, Grose R. (2003): Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiol Rev* 83, 835-70.
- Werner S, Smola H, Liao X, Longaker MT, Krieg T, Hofschneider PH, Williams LT. (1994): The function of KGF in morphogenesis of epithelium and reepithelialization of wounds. *Science* 266, 819-22.
- Wilgenbus KK, Lichter P. (1999): DNA chip technology ante portas. *J Mol Med* 77, 761-768.
- Wojta J, Kaun C, Breuss JM, Koshelnick Y, Beckmann R, Hattey E, Mildner M, Weninger W, Nakamura T, Tschachler E, Binder BR. (1999): Hepatocyte growth factor increases expression of vascular endothelial growth factor and plasminogen activator inhibitor-1 in human keratinocytes and the vascular endothelial growth factor receptor flk-1 in human endothelial cells. *Lab Invest* 79, 427-38.
- Yamasaki N, Nagano T, Mori-Kudo I, Tsuchida A, Kawamura T, Seki H, Taiji M, Noguchi H. (2002): Hepatocyte growth factor protects functional and histological disorders of HgCl₂-induced acute renal failure mice. *Nephron* 90, 195-205.

- Yao B, Rakhade SN, Li Q, Ahmed S, Krauss R, Draghici S, Loeb JA. (2004): Accuracy of cDNA microarray methods to detect small gene expression changes induced by neuregulin on breast epithelial cells. *BMC Bioinformatics* 5, 99-115.
- Yoshida S, Matsumoto K, Tomioka D, Bessho K, Itami S, Yoshikawa K, Nakamura T. (2004): Recombinant hepatocyte growth factor accelerates cutaneous wound healing in a diabetic mouse model. *Growth Factors* 22, 111-9.
- Yoshida S, Yamaguchi Y, Itami S, Yoshikawa K, Tabata Y, Matsumoto K, Nakamura T. (2003): Neutralization of hepatocyte growth factor leads to retarded cutaneous wound healing associated with decreased neovascularization and granulation tissue formation. *J Invest Dermatol* 120, 335-43.
- Yoshinaga Y, Matsuno Y, Fujita S, Nakamura T, Kikuchi M, Shimosato Y, Hirohashi S. (1993): Immunohistochemical detection of hepatocyte growth factor/scatter factor in human cancerous and inflammatory lesions of various organs. *Jpn J Cancer Res* 84, 1150-8.
- Zarnegar R. (1995): Regulation of HGF and HGFR gene expression. *EXS* 74, 33-49.
- Zegers MM, Forget MA, Chernoff J, Mostov KE, ter Beest MB, Hansen SH. (2003): Pak1 and PIX regulate contact inhibition during epithelial wound healing. *EMBO J.* 22, 4155-65.
- Zeigler ME, Chi Y, Schmidt T, Varani J. (1999): Role of ERK and JNK pathways in regulating cell motility and matrix metalloproteinase 9 production in growth factor-stimulated human epidermal keratinocytes. *J Cell Physiol* 180, 271-84.
- Zeigler ME, Dutchesen NT, Gibbs DF, Varani J. (1996b): Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: expression and role of matrix metalloproteinases. *Invasion Metastasis* 16, 11-8.
- Zeigler ME, Krause S, Karmiol S, Varani J. (1996a): Growth factor-induced epidermal invasion of the dermis in human skin organ culture: dermal invasion correlated with epithelial cell motility. *Invasion Metastasis* 16, 3-10.
- Zeng Q, Chen S, You Z, Yang F, Carey TE, Saims D, Wang CY. (2002): Hepatocyte growth factor inhibits anoikis in head and neck squamous cell carcinoma cells by activation of ERK and Akt signaling independent of NFkappa B. *J Biol Chem* 277, 25203-8.
- Zhang X, Li Y, Dai C, Yang J, Mundel P, Liu Y. (2003): Sp1 and Sp3 transcription factors synergistically regulate HGF receptor gene expression in kidney. *Am J Physiol Renal Physiol* 284, F82-94.

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ⁺ A
95.	GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	2919	298,6	15,37	400,93	13,14	1,34	102.	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	418,18	42,84	235,3	6,34	-1,78
96.	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B (19kD), alpha isoform (calcieneurin B, type I)	AL544951	5534	294,33	9,36	187,94	5,81	-1,57	103.	C3H-type zinc finger protein; similar to D. melanogaster muscleblind B protein	AI088145	10150	275,81	18,27	175,64	6,91	-1,57
97.	KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	380,83	13,7	204,19	3,57	-1,87	104.	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	378,48	15,56	363,85	10,71	1,49
98.	diclkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	22943	309,47	14,48	421,17	22,65	1,36	105.	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 (gamma, 52kD)	NM_001415	1968	496,45	12,46	353,79	8,06	-1,4
99.	keratin 15	NM_002275	3866	1596,55	60,27	2291,28	66,68	1,44	106.	proteinase, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002270	5645	986,96	7,69	696,55	5,74	-1,42
100.	neuronal protein	NM_013259	29114	166,54	9,86	333,56	13,3	2	107.	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	227,39	12,3	351,42	11,94	1,55
101.	Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	350,97	12,72	455,92	10,32	1,3	108.	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	NM_001062	6947	630,97	15,37	455,95	19,73	-1,38
109.	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	410,64	27,15	667,66	27,01	1,63	163.	four and a half LIM domains 1	AF098518	2273	630,54	20,66	455,27	9,94	-1,38
110.	kallikrein 13	NM_015596	26085	425,1	10,5	652,47	8,34	1,53	164.	parathyroid hormone-like hormone	JO3580	5744	578,61	10,62	793,56	5,41	1,37
111.	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	735,36	26,79	526,32	14,22	-1,4	165.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	1312,84	15,22	857,75	17,73	-1,53
112.	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	1010,26	21,04	752,37	19,33	-1,34	166.	actin binding LIM protein 1	BC002448	3983	519,54	7,55	384,37	8,05	-1,35
113.	parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	418,21	27,53	588,39	23,41	-1,41	167.	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	437,67	12,65	717,72	8,54	1,66
114.	interferon, gamma-inducible protein 16	NM_005531	3428	384,44	12,53	275,19	14,74	-1,4	168.	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	9590	335,83	12,52	672,37	21,43	2
115.	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	NM_003412	7545	240,73	8,13	137,21	6,39	-1,75	169.	chromosome 14 open reading frame 143	BC001787	452,88	1,54	318,74	4,22	-1,42	
116.	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	2588,44	37,2	1805,92	40,93	-1,43	170.	LIM domain kinase 2	AL117466	3985	433,69	22,24	327,27	8,36	-1,33
117.	development and differentiation enhancing factor 2	NM_003887	8853	229,01	8,77	332,17	13,9	1,45	171.	plasmidogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	486,05	13,91	932,52	21,25	1,92
118.	hypothetical protein MGC10771	NM_024506	79411	377,01	5,77	271,87	4,96	-1,39	172.	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891	450,43	13,23	593,92	12,38	1,32	
119.	keratin, hair, acidic,1	NM_002277	9881	219,82	14,49	338,07	16,83	1,54	173.	interleukin 13 receptor, alpha 1	U81380	3597	387,26	9,35	177,94	20,32	-2,18
120.	Ste20-related serine/threonine kinase	NM_014720	3748	273,18	16,32	378,83	8,54	1,39	174.	prefoldin 5	AB055804	5204	1152,67	47,44	845,69	15,23	-1,36
121.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	795,32	39,47	549,9	22,61	-1,45	175.	WD repeat domain 1	AF274954	573,94	26,38	360,56	12,16	-1,59	
122.	variable charge protein on X with two repeats	NM_016378	51480	280,2	7,6	176,15	8,47	-1,59	176.	tropomyosin 1 (alpha)	Z24727	7168	343,19	13,98	476,18	11,2	1,39
123.	stauflen, RNA binding protein (Drosophila)	NM_004602	6780	417,56	11,23	552,74	9,71	1,32	177.	cytochrome c oxidase subunit Vb	BC006229	1329	1246,8	53,11	891,48	27,12	-1,4
124.	protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	791,8	22,2	566,1	23,97	-1,4	178.	folate receptor 1 (adult)	AF000381	768,15	16,97	335,29	30,3	-2,29	
125.	karyopherin (importin) beta 2	NM_002270	3842	486,86	17,44	353	15,09	-1,38	179.	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	AF115544	1029	330,13	8,7	227,95	11,65	-1,45
126.	GRO3 oncogene	NM_002090	2921	155,99	10,94	275,57	13,56	1,77	180.	actinin, alpha 1	M95178	87	648,46	13,23	855,95	25,35	1,32
127.	keratin 13	NM_002274	3860	398,22	13,81	675,54	16,23	1,7	181.	interleukin 8	AF043337	3576	341,54	15,86	543,16	17,08	1,59
128.	liver-specific bHLH-Zip transcription factor	NM_015925	51599	188,12	8,8	315,88	11,19	1,68	182.	cyclin G2	L49506	901	341,5	11,94	49,52	10,66	1,32
129.	midline 2	NM_012216	11043	328,69	6,99	222,41	10,9	-1,48	183.	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	383,24	6,85	260,07	4,34	-1,47
130.	serine/arginine repetitive matrix 2	AI655799	23524	343,57	10,33	210,23	4,57	-1,63	184.	glutathione synthetase	L42531	2937	464,38	18,59	356,65	9,33	-1,3
131.	filamin B, beta (actin binding protein 278)	M62994	2317	510,49	22,47	668,58	9,76	1,31	185.	aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	M33376	448,49	10,76	320,33	11,65	-1,4	
132.	bromodomain-containing 2	AA902767	6046	621,3	25,88	450,24	21,71	-1,38	186.	plasmidogen activator, urokinase	K03226	5328	1089,7	36,98	1466,72	34,38	1,35
133.	cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kD)	BC002711	998	1652,53	61,34	968,03	27,47	-1,71	187.	Homo sapiens PNAS-20	AF274945	240,54	10,43	135,84	15,96	-1,77	
134.	dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	266,66	7,28	373,98	10,08	1,4	188.	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	AF349444	23741	134,14	5,94	239,38	4,59	1,78
135.	ring finger protein 11	AB024703	26994	321,02	8,27	430,28	9,76	1,34	189.	parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	808,02	21,28	1236,3	45,81	1,53
136.	transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD)	D50683	7048	270,46	6,52	375,21	13,87	1,39	190.	plasmidogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	637,06	31,76	1029,36	26,74	1,62
137.	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	229,95	23,83	376,93	8,61	1,64	191.	myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	AI827941	4627	413,29	20,02	638,94	18,43	1,55
138.	polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BF248165	10605	494,16	14,5	351,88	9,85	-1,4	192.	RNA binding motif protein 9	N95026	23543	547,23	19,71	390,67	13	-1,4
139.	connective tissue growth factor	MG2934	1490	149,73	8,77	269,3	8,94	1,8	193.	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	371,6	21,05	249,95	3,93	-1,49
140.	tetraspan 1	AF133425	10103	243,06	21,68	359,25	11,41	1,48	194.	v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	AK000311	271,18	15,68	382,71	11,41	1,41	
141.	tubulin, alpha 3	AF141347	7846	336,01	13,1	231,05	8,75	-1,45	195.	602381262F1 NIH_MGC_93 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4499078 5'	BG289001	358,16	16,27	237,56	5,25	-1,51	
142.	DKFZp564K1671_s1 564 (synonym: hfr2)	AF037401	4022,8	11,05	25,09	5,36	-1,6	196.	fibronectin 1	X02761	2335	750,21	20,49	984,4	41,54	1,31	
143.	insulin receptor subunit 3	AF073310	8660	371,83	9,43	226,65	9,31	-1,64	197.	Homo sapiens clone FBD3 Cri-du-chat critical region	AF056433	417,84	9,79	312,52	7,82	-1,34	
144.	Kruppel-like factor 5 (intestinal)	AB030824	688	508,89	12,25	332,13	11,73	-1,53	198.	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3	R60068	1654	1081,65	44,32	795,07	8,21	-1,36
145.	up-regulated by BCG-CWS	AB040120	64116	252,35	12,68	359,73	8,6	1,43	199.	602565589F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4690079 5'	BG537190	1695,32	60,92	2334,65	40,49	1,38	
146.	laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	L25541	3914	1480,46	44,61	1954,65	59,56	1,32	200.	C-terminal binding protein 1	BF337195	1487	411,32	12,01	304,06	13,11	-1,35
147.	tropomyosin 4	BC002827	7171	235,84	10,75	337,48	13,56	1,43	201.	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AJ131244	10802	434,18	8,93	326,22	4,53	-1,33
148.	smoothelin	AF064238	6525	365,7	14,09	491,22	14,34	1,34	202.	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	BE645231	10802	86,47	8,27	187,03	11,62	2,16
149.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	U19556	6317	1361,04	45,18	1012,71	24,7	-1,34	203.	wr39d10.x1 NCI_CGAP_Pr28 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2490067 3'	AI972416	569,7	23,51	406,24	16,22	-1,4	
150.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	8317	770,89	15,02	566,7	11,46	-1,36	204.	tousled-like kinase 2	AI151689	11011	468,1	12,31	336,86	4,48	-1,39
151.	Microfibril-associated glycoprotein-2	U37283	6076	434,74	26,54	607,35	16,17	1,4	205.	myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	AA770596	4082	358,98	6,93	235,56	2,95	-1,52
152.	microfibrillar-associated protein 2	AL049569	4237	519,89	7,82	287,49	9,3	-1,81	206.	karyopherin (importin) beta 1	BG249565	3837	703,96	26,56	974,56	29,61	1,38
153.	kallikrein 10	BC002710	5655	3085,09	49,07	4237,5	87,07	1,37	207.	myosin IF	BF740152	4542	215,41	6,19	72,18	13,44	-2,98
154.	tumor suppressing subtransferable candidate 3	AF001294	7262	1405,26	45,25	2046,25	90,1	1,46	208.	eukaryotic translation initiation factor 5A	BF541557	1984	582,06	35,71	353,24	30,08	-1,65
155.	calmodulin-like 3	M58026	810	342,76	8,96	229,44	5,44	-1,49	209.	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)	AI379338	427	367,98	8,12	260,39	13,17	-1,41
156.	uroplakin 1B	NM_006952	7348	337,43	7,27	450	16,54	1,33	210.	ADP-ribosylation protein 6	AA243143	382	566,48	18,72	385,91	8,79	-1,47
157.	cathepsin L2	AF070448	1515	1365,13	56,39	1886,94	35,61	1,38	211.	splicing factor 3b, subunit 1, 155kD	AW003030	23451	716,53	19,95	488,81	8,07	-1,47
158.	dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	AF186773	8444	286,34	4,7	179,87	13,32	-1,59	212.	trefoil factor 2 (spasmodic protein 1)	NM_005423	7032	311,21	5,81	201,85	8,45	-1,54
159.	pinin, desmosome associated protein	AF112222	5411	2132,44	78,36	1532,83	44,07	-1,39									
160.	bridging integrator 1	AF001383	274	416,64	6,67	269,66	9,86	-1,57									
161.	heat shock 90kD protein alpha 1	AF028832	3320	1167,63	59,11	1593,88	31,12	1,33									
162.	polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BC005295	10605	381,01	16,95	264,49	4,03	-1,44									



Fortsetzung von Tabelle A: Zielgene von HGF in Versuch A

Anhang 116

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ^{-/-} A	Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{-/-} SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ^{-/-} A
213. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	AY007087	7392	421,21	9,51	303,45	15,74	-1,39	220. Human DNA sequence from clone RP1-30P20 on chromosome Xq21.1-21.3 Contains a SET translocation (myeloid leukemia-associated) (SET) pseudogene	Z95126		524,74	24,09	368,41	22,79	-1,42
214. bromodomain-containing 2	S78771	6046	469,66	10,97	321,34	16,19	-1,46	221. poly(A) binding protein, cytoplasmic, pseudogene 3	U64661	26978	2891,29	120,2	2087,92	50,48	-1,38
215. amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	X06989	351	818,02	38,68	445,09	19,54	-1,84	222. chromosome 11 open reading frame 9	AC004770	745	437,92	8,97	284,7	3,67	-1,54
216. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	402,8	25,54	598,2	13,17	1,49	223. protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)	X86428	5524	463,61	7,28	354,5	8,05	-1,31
217. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)	BG166705	6374	142,6	7,48	246,32	6,73	1,73	224. IIR domain containing 3	AL031602		1981	29,43	1478,26	73,54	-1,34
218. peroxisome receptor 1	AW468717	5830	225,75	7,67	120,23	6,61	-1,88								
219. chromosome condensation 1	X06130	1104	364,64	12,26	261,28	10,96	-1,4								
225. protocadherin gamma subfamily A, 3	AF152509	56112	192,65	5,96	89,01	7,29	-2,16								
226. CGI-53 protein	AL121886	51098	319,12	6,03	209,94	6,39	-1,52								
227. Human DNA sequence from clone RP5-107L10 on chromosome 20 Contains part of the TMSB4L gene for thymosin beta 4-like and the 3' end of the BCAS4 gene for breast carcinoma amplified sequence 4	AL133228		3095,24	96,84	4114,1	107,37	1,33								
228. Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	M14087		393,9	8,25	289,39	6,25	-1,36								
229. aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	S68290	1645	583,15	13,09	368,69	8,7	-1,58								
230. nebulin	AL157398		421,52	8,39	307,34	9,54	-1,37								
231. metallothionein 1F (functional)	M10943	4494	1956,42	30,15	1397,53	22,68	-1,4								
232. butyrophilin-like 3	AK025267	10917	415,5	7,01	305,92	2,25	-1,36								
233. Homo sapiens aconitase precursor (ACON)	AF086790		539,99	9,66	376,33	14,67	-1,43								
234. leucine rich repeat containing 16	AL024509		533,17	11,57	390,86	6,31	-1,36								
235. fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma	S75762	2521	375,17	12,12	266,2	14,69	-1,41								
236. collagen, type I, alpha 1	Y15916	1277	526,56	18,57	377,58	7,08	-1,39								
237. HUMBT Chromosome 16p13.3 Exon Homo sapiens genomic clone h-80	L48784		703,21	3,13	515,99	10,29	-1,36								
238. phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1), pseudogene 1	AF023139	11191	444,12	24,59	267,33	26,93	-1,66								
239. small EDRK-rich factor 2	NM_005770	10169	2221,87	49,49	1519,62	69,42	-1,46								
240. cell division cycle 27	NM_001256	996	255,84	8,1	152,32	8,86	-1,68								
241. hypothetical protein FLJ10350	NM_018067	55700	415,13	14,6	545,33	14,66	1,31								
242. pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AI795908	22822	635,46	34,52	855,08	22,48	1,35								
243. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK)	NM_004887	9547	278,81	10,43	162,38	5,73	-1,72								
244. 40S ribosomal protein S27 isoform	NM_015920	51065	398,15	13,07	541,79	17,05	1,36								
245. likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60685	457,6	12,74	288,79	9,66	-1,58								
246. FXD domain-containing ion transport regulator 5	NM_014164	53827	581,97	19,08	786,21	21,68	1,35								
247. adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	NM_005498	10053	457,43	13,53	344,07	15,18	-1,33								
248. trichorhinophalangeal syndrome 1	NM_014112	7227	325,26	4,34	211,55	4,55	-1,54								
249. pseudouridylyl synthase 1	NM_025215	80324	187,5	4,25	69,33	19	-2,7								
250. glycolipid transfer protein	NM_016433	51228	754,87	36,35	539,04	20,48	-1,4								
251. hypothetical protein FLJ10134	NM_018004	55076	1158,82	39,05	873,29	36,48	-1,33								
252. claudin 15	NM_014343	24146	495,87	14,35	314,25	15,85	-1,58								
253. erythroid differentiation-related factor	NM_016633	51327	334,82	7,91	230,1	6,66	-1,46								
254. retinol dehydrogenase homolog	NM_005771	10170	395,91	11	292,11	8,01	-1,36								
255. hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	375,02	9,12	503,88	15,86	1,34								
256. F-box protein 17	NM_024907	79967	244,21	4,21	121,18	10,19	-2,02								
257. hypothetical protein FLJ11710	NM_024846	79904	412,64	10,74	297,4	4,72	-1,39								
258. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	375,59	22,54	123,63	8,75	-3,04								
259. NICE-1 protein	NM_019060	54544	1572,17	85,81	2193,58	79,34	1,4								
260. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	706,75	32,67	493,75	34,53	-1,43								
261. hypothetical protein My014	NM_030918	81609	398,25	6,62	226,67	10,64	-1,76								
262. UL16 binding protein 2	NM_025217	80328	393,41	8,72	510,64	13,96	1,3								
263. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		893,4	64,92	438,73	41,09	-2,04								
264. hypothetical protein FLJ20258	BC004907	54869	176,18	9,81	288,58	13,15	1,64								
265. 3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	BG035985	3157	219,06	5,77	319,83	7,61	1,46								
266. AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		709,97	3,79	960,54	8,51	1,35								
267. y31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		295,25	3,73	166,84	6,9	-1,77								
268. guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	AI719730	2982	98,69	3,95	199,39	14,05	2,02								
269. leucine-rich repeat protein, neuronal 1	AI631881	4034	496,27	7,64	378,72	9,27	-1,31								
270. hypothetical protein	AK023069	51531	391,87	8,6	271,4	7,92	-1,44								

Tabelle B: Zielgene von KGF in Versuch A

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁻	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁻ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A
1.	peroxisomal biogenesis factor 16	AA523441	9409	550,43	8,14	400,76	19,22	-1,37									
2.	Cluster Incl. AA150503	AA150503		310,57	6,68	187,65	5,13	-1,66									
3.	high density lipoprotein binding protein (vigilin)	NM_005336	3069	424,98	12,17	564,76	21,81	1,33									
4.	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	371,49	15,3	491,48	20,54	1,32									
5.	FK506 binding protein 1A (12kD)	NM_000801	2280	751,88	17,53	984,89	20,1	1,31									
6.	heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	456,3	10,38	688,37	26,6	1,51									
7.	heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	482,5	10,62	682,72	18,14	1,41									
8.	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)	NM_003144	6745	438,98	18,34	603,62	12,09	1,38									
9.	RAB14, member RAS oncogene family	U19115	51552	326,88	12,35	435,13	11,38	1,33									
10.	cytoskeleton-associated protein 4	AW029619	10970	358,6	11,46	248,57	5,46	-1,44									
11.	cytoskeleton-associated protein 4	NM_006825	10970	814,52	29,92	611,7	13,18	-1,33									
12.	chromodomain helicase DNA binding protein 4	NM_001273	1108	430,4	20,78	319,82	8,77	-1,35									
13.	enolase 1, (alpha)	NM_001428	2023	1250,91	46,58	2078,74	66,55	1,36									
14.	pyruvate kinase, muscle	NM_002654	5315	1330,52	34,32	1765,72	52,88	1,33									
15.	GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 (Sam68)	BC000717	10657	438,55	10,42	337,73	10,87	-1,3									
16.	Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	BG500067	10146	445,51	20,47	594,73	23,4	1,33									
17.	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	NM_002078	2803	250,5	7,31	359,96	11,03	1,44									
18.	keratin 19	NM_002276	3880	262,95	6,63	379,55	5,98	1,44									
19.	corichon-like	NM_005776	10175	355,6	13,19	478,8	16,08	1,35									
20.	ribosomal protein S17	NM_001021	6218	5860,22	90,29	4468,63	222,33	-1,31									
21.	protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	NM_006253	5564	135,53	5,57	296,06	23,35	2,18									
22.	ribosomal protein L38	BC000603	6169	317,5	15,87	444,34	18,65	1,4									
23.	baculoviral IAP repeat-containing 2	NM_001166	329	380,86	21,92	609,66	30,04	1,6									
24.	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	5019,1	189,12	3732,96	126,53	-1,34									
25.	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophycin)	NM_001357	1660	301,81	26,37	444,62	17,94	1,47									
26.	discs, large (Drosophila) homolog 1	BG251175	1739	304,27	12,82	485,74	20,84	1,6									
27.	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AJ738896	7128	412,78	19,01	543,71	16,35	1,32									
28.	RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	NM_002890	5921	759,61	15,52	990,5	22,62	1,3									
29.	interleukin 8	NM_000584	3576	859,39	47,21	1242,92	59,63	1,45									
30.	zinc metalloproteinase (STE24 homolog, yeast)	NM_005857	10269	587,83	19,85	798,44	23,41	1,36									
31.	dynamitin 1-like	NM_012062	10059	314,25	13,33	416,21	14	1,32									
32.	Wilms' tumour 1-associating protein	NM_004906	9589	240,69	10,17	341,13	17,82	1,42									
33.	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	656,27	15,07	496,61	12,35	-1,32									
34.	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	273,86	17,65	421,44	5,4	1,54									
35.	thrombomodulin	NM_000361	7056	347,82	11,48	241,23	7,8	-1,44									
36.	S100 calcium binding protein P	NM_005980	6286	944,9	44,02	711,13	28,19	-1,33									
37.	mitochondrial ribosomal protein 63	NM_024026	78988	304,94	44,48	484,88	9,86	1,59									
38.	KIAA0537 gene product	NM_014840	1891	380,83	13,7	262,36	6,25	-1,45									
39.	desmocollin 2	BF196457	1824	420,7	16,63	617,23	18,48	1,47									
40.	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	418,18	42,84	221,03	8,58	-1,89									
41.	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	378,48	15,56	491,45	9,34	1,3									
42.	dihydrochalcone branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)	NM_001918	1629	315,53	21,8	452,23	5,48	1,43									
43.	transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	NM_001062	6947	630,97	15,37	450,86	11,18	-1,4									
44.	bone morphogenetic protein 1	NM_001199	649	296,33	6,73	193,67	16,69	-1,53									
45.	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NM_004741	9221	228,77	26,91	340	15,6	1,49									
46.	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	735,36	26,79	545,39	15,75	-1,35									
47.	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	1010,26	21,04	696,61	28,94	-1,45									
48.	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	2588,44	37,2	1764,29	28,43	-1,47									
49.	hypothetical protein FLJ20059	NM_017644	54800	357,45	4,19	465,18	2,29	1,3									
50.	G protein-coupled receptor 56	NM_005682	9289	295,83	13,07	189,66	9,37	-1,56									
51.	bone morphogenetic protein 1	NM_006128	649	429,94	7,74	263,95	20,75	-1,63									
52.	transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	949,85	21,34	1237,29	45,28	1,3									
53.	protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	791,8	22,2	582,05	17,04	-1,36									
54.	suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting protein)	U17714	6767	506,48	16,04	317,36	20,86	-1,6									
55.	basigin (OK blood group)	AL550657	682	295,91	12,15	482,48	10,18	1,63									
56.	transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	980,91	21,67	1312,45	38,16	1,34									
57.	membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte)	AL570661	4179	406,94	7,38	551,71	13,92	1,36									
108.	hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	375,59	22,54	213,88	7,83	-1,76									
109.	amino acid transporter 2	NM_018976	54407	611,83	28,73	796,04	13,9	1,3									
58.	cross-reactive antigen)	L18887	821	404,15	6,2	529,04	10,18	1,31									
59.	calnexin	BC002719	8669	229,95	23,83	364,74	9,09	1,59									
60.	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	AH72757	10492	283,68	18,91	395,59	19,98	1,39									
61.	NS1-associated protein 1	AB040120	64116	252,35	12,68	358,85	12,06	1,42									
62.	up-regulated by BCG-CVWS	AF002280	27295	115,07	9,42	394,63	22,4	3,43									
63.	alpha-actinin-2-associated LIM protein	BC005224	6317	770,89	15,02	563,73	12,5	-1,37									
64.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC003574	8115	113,71	11,09	290,26	15,46	2,55									
65.	T-cell leukemia/lymphoma 1A	M58026	810	342,76	8,96	224,79	5,89	-1,52									
66.	calmodulin-like 3	BC000433	5603	388,41	10,41	206,75	19,75	-1,88									
67.	mitogen-activated protein kinase 13	U28936	7531	501,23	25,34	777,87	16,37	1,55									
68.	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	U73945	1672	656,09	17,02	445,78	22,41	-1,47									
69.	defensin, beta 1	U19557	6318	1312,84	15,22	970,14	13,18	-1,35									
70.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U97075	8837	1290,7	32,92	981,19	19,01	-1,32									
71.	CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	U46746	1837	279,93	7,25	174,99	7,9	-1,6									
72.	inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	144,43	46,94	1021,05	74,22	7,07									
73.	melanoma cell adhesion molecule	M29277	4162	81,34	8,23	200,09	12,46	2,46									
74.	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein	U43430	7531	318,29	8,11	439,44	20,12	1,38									
75.	folate receptor 1 (adult)	AF000381		768,15	16,97	1474,67	33,4	1,92									
76.	annexin A2 pseudogene 3	M62895	305	336,2	11,85	475,28	9,3	1,41									
77.	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	383,24	6,85	268,42	4,44	-1,43									
78.	protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	U20489	5800	559,38	17,11	802,82	26,82	1,44									
79.	Homo sapiens PNAS-20	AF274945		240,54	10,43	610,46	19,17	2,54									
80.	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	NM_003079	6605	276,39	24,02	388,98	12,06	1,41									
81.	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	371,6	21,05	219,17	7,71	-1,7									
82.	60146954F1 NIH_MGC_67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3873157 5'	BE780075		507,94	19,84	659,79	14,57	1,3									
83.	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	NM_005564	3934	1125,83	20,77	853,36	14,36	-1,32									
84.	KIAA0993 protein	AL536319	23001	82,53	4,22	189,46	11,94	2,3									
85.	ras homolog gene family, member E	BG054844	390	547,94	24,64	770,43	26,73	1,41									
86.	AL520675 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 10-NORMALIZED Homo sapiens cDNA clone CS0DB002YF15 3'-PRIME	AL520675		278,35	13,34	149,17	17,68	-1,87					</				

Gen

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF A c-jun ⁺ A
34.	transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD, elongin A)	A1344128	6924	513,01	9,04	385,52	6,39	-1,33
35.	interleukin 8	NM_000584	3576	859,39	47,21	1175,36	25,39	1,37
36.	protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	D86043	8194	374,32	10,75	252,63	8,64	-1,48
37.	nucleoporin 88kD	NM_002532	4927	590,19	14,91	442,37	6,84	-1,33
38.	fibulin 5	NM_006329	10516	421,87	8,57	262,17	3,46	-1,61
39.	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	656,27	15,07	454	8,76	-1,45
40.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (12kD, B12)	NM_002491	4709	479,29	17,01	686,42	32,1	1,43
41.	hairy homolog (Drosophila)	NM_005524	3280	302,6	9,42	412,11	17,56	1,36
42.	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	273,86	17,65	481,9	13,3	1,76
43.	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	NM_001353	1645	723,68	18,87	544,23	18,09	-1,33
44.	hypothetical protein	NM_013386	29957	210,55	7,58	317,57	6,1	1,51
45.	coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001993	2152	1038,45	39,8	1458,32	52,35	1,4
46.	mitochondrial ribosomal protein 63	NM_024026	78988	304,94	44,48	523,05	20,04	1,72
47.	KIA0537 gene product	NM_014840	9891	380,83	13,7	266,81	9,37	-1,43
48.	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	418,18	42,84	127,37	26,78	-3,28
49.	clathrin, light polypeptide (Lcb)	NM_007097	1212	1306,38	24,61	941,22	13,09	-1,39
50.	dihydrolipoamide branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)	NM_001918	1629	315,53	21,8	465,72	13,36	1,48
51.	protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	986,96	7,79	707,68	8,99	-1,39
52.	calbindin 2, (29kD, calretinin)	NM_001740	794	382,64	7,74	275,45	10,88	-1,39
53.	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	NM_000694	221	243,15	9,63	130,04	7,05	-1,87
54.	protocadherin gamma subfamily C, 3	NM_002588	5098	584,25	10,31	403,4	16,69	-1,45
55.	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NM_004741	9221	228,77	26,91	336,78	13,45	1,47
56.	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	735,36	26,79	553,02	16,74	-1,33
57.	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	1010,26	21,04	771,88	12,92	-1,31
58.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	795,32	39,47	564,54	17,51	-1,41
59.	protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	791,8	22,2	547,84	17,75	-1,45
60.	rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	NM_004723	9181	393,63	10,66	286,64	2,12	-1,37
61.	keratin 13	NM_002274	3860	398,22	13,81	600,95	33,04	1,51
62.	transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	980,91	21,67	1281,66	32,81	1,31
63.	voltage-dependent anion channel 3	BC002456	7419	451,52	32,24	627,22	18,22	1,39
64.	complement component 1, q subcomponent binding protein	L04636	708	424,58	18,64	596,9	12,23	1,41
65.	ring finger protein 11	AB024703	26994	321,02	8,27	448,73	9,39	1,4
71.	member 3	U37283	8076	434,74	26,54	621,52	25,89	1,43
72.	microfibrillar-associated protein 2	AL049569	4237	519,89	7,82	401,42	4,46	-1,3
73.	tumor suppressing subtransferable candidate 3	AF001294	7262	1405,26	45,25	1919,44	65,7	1,37
74.	calmodulin-like 3	M58026	810	342,76	8,96	229,21	5,96	-1,5

Fortsetzung von Tabelle C: Zielgene von GM-CSF in Versuch A

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF A c-jun ⁺ A
75.	chromosome 20 open reading frame 1	AF098158	22974	260,8	8,66	366,14	5,1	1,4	112.	Homo sapiens cDNA: FLJ22535 fis, clone HRC13115, highly similar to AF152336 Homo sapiens protocadherin gamma B7 (PCDH-gamma-B7)	AK026188		591,65	5,08	431,44	14,32	-1,37
76.	uroplakin 1B	NM_006952	7348	337,43	7,27	441,35	10,5	1,31	113.	chromosome 11 open reading frame 9	AC004770	745	437,92	8,97	319,59	5,64	-1,37
77.	nuclear receptor coactivator 1	U59302	8648	241,42	4,7	111,72	15,75	-2,16	114.	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	X63575	491	164,92	4,47	53,47	16,45	-3,08
78.	polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BC005295	10605	381,01	16,95	254,37	6,58	-1,5	115.	Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		365,72	12,17	531,45	6,65	1,45
79.	four and a half LIM domains 1	AF098518	2273	630,54	20,66	467,5	13,42	-1,35	116.	breast carcinoma amplified sequence 4, thymosin-like 6	AL133228		3095,24	96,84	4227,66	113,79	1,37
80.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	1312,84	15,22	938,16	18,22	-1,4	117.	Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	M14087		393,9	8,25	281,38	5,06	-1,4
81.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	89,97	18,63	226,58	13,59	2,52	118.	discs, large homolog 1 (Drosophila)	AL121981		108,67	11,94	217,87	9,58	2
82.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	M19156	3858	965,12	47,73	710,2	31,58	-1,36	119.	ribosomal protein L15	Z97353	6138	295,53	12,4	414,7	6,82	1,4
83.	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	144,43	46,94	490,37	15,58	3,4	120.	Homo sapiens aconitase precursor (ACON) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein	AF086790		539,99	9,66	391,38	10,02	-1,38
84.	interleukin 13 receptor, alpha 1	U81380	3597	387,26	9,35	209,99	17,36	-1,84	121.	zu53c08.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:741710 3' similar to contains Alu repetitive element	AA401963		188,4	15,62	307,24	4,58	1,63
85.	protocadherin gamma subfamily C, 3	BC006439	5098	648,29	6,42	395,71	23,01	-1,64	122.	chromosome 11 hypothetical protein ORF3	NM_020154	56851	348,91	13,04	464,5	10,03	1,33
86.	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	AF115544	1029	330,13	8,7	223,98	7,68	-1,47	123.	40S ribosomal protein S27 isoform	NM_015920	51065	398,15	13,07	526,42	21,36	1,32
87.	annexin A2 pseudogene 3	M62895	305	336,2	11,85	496,33	10,62	1,48	124.	likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60685	457,6	12,74	319,62	3,71	-1,43
88.	granulin	BC000324	2896	816,68	18,99	605,96	13,95	-1,35	125.	hypothetical protein FLJ10154	NM_018011	55082	325,98	12,61	450,84	21,33	1,38
89.	interleukin 8	AF043337	3576	341,54	15,86	468,88	16,71	1,37	126.	G protein-coupled receptor kinase 7	NM_017572	2872	352,7	21,7	494,13	7,29	1,4
90.	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	383,24	6,85	267,84	7,47	-1,43	127.	G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	403,43	13,11	546,55	19,9	1,35
91.	CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	AF349444	23741	134,14	5,94	265,7	4,91	1,98	128.	hypothetical protein FLJ11286	NM_018381	55337	229,89	12,1	339,06	9,5	1,47
92.	unactive progesterone receptor, 23 kD	BE903880	10728	1009,98	23,22	1315,47	41,58	1,3	129.	trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	325,26	4,34	200,54	2,29	-1,62
93.	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	371,6	21,05	260,26	10,41	-1,43	130.	hypothetical protein	NM_019000	54463	246,39	7,69	125,33	14,23	-1,97
94.	agrin	AW008051	180	513	17,8	687,58	22,8	1,34	131.	pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	187,5	4,25	80,23	19,62	-2,34
95.	601469954F1 NIH_MGC_67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3873157 5'	BE780075		507,94	19,84	669,39	18,02	1,32	132.	CGI-119 protein	NM_016056	51643	234,78	17,83	358,63	16,73	1,53
96.	lysophospholipase I	BG288007	10434	505,23	13,7	676,62	14,61	1,34	133.	Rh type C glycoprotein	NM_016321	51458	935,06	20,87	662,74	14,87	-1,41
97.	ho62c10.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3041970 3'	AW873564		657,15	13,6	480,62	13,51	-1,37	134.	RAB3A interacting protein (rab3)-like 1	NM_013401	5866	410,13	7,52	296,27	7,17	-1,38
98.	KIAA0356 gene product	AB002354	9842	471	13,63	342,04	11,98	-1,38	135.	claudin 15	NM_014343	24146	495,87	14,35	299,47	8,88	-1,66
99.	SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AJ131244	10802	434,18	8,93	326,19	5,13	-1,33	136.	erythroid differentiation-related factor	NM_016633	51327	334,82	7,91	232,26	5,47	-1,44
100.	keratin 4	X07695	3851	466,48	13,54	340,13	19,32	-1,37	137.	hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	375,02	9,12	506,13	13,4	1,35
101.	ribosomal protein L27	BE312027	6155	425,72	16,67	321,8	7,36	-1,32	138.	hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	375,59	22,54	105,04	15,17	-3,58
102.	myosin IF	BF740152	4542	215,41	6,19	64,25	16,03	-3,35	139.	inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	706,75	32,67	509,49	17,36	-1,39
103.	myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	AA419227	4637	336,71	13,79	483,75	11,53	1,44	140.	natriuretic peptide precursor C	NM_024409	4880	157,11	10,67	45,71	12,71	-3,44
104.	protein kinase C substrate 80K-H	AI815793	5589	820,56	21,2	608,87	10,28	-1,35	141.	Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307	893,4	64,92	1279,28	38,42	1,43	
105.	heat shock 90kD protein 1, alpha	R01140	3320	2117,72	67,69	2852,95	94,81	1,35	142.	ribulose-5-phosphate-3-epimerase	BE964473	6120	154,14	18,63	254,18	7,75	1,65
106.	trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	NM_005423	7032	311,21	5,81	198,43	6,03	-1,57	143.	oy31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3	AI057637		295,25	3,73	170,2	7,48	-1,73
107.	KIAA0328 protein	AB002326	23147	133,66	9,26	241,44	6,06	1,81									
108.	upstream transcription factor 2, c-fos interacting	AY007087	7392	421,21	9,51	290,53	13,28	-1,45									
109.	phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	402,8	25,54	558,9	16,73	1,39									
110.	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)	BG166705	6374	142,6	7,48	248,56	9,74	1,74									
111.	poly(A) binding protein, cytoplasmic, pseudogene 3	U64661	26978	2891,29	120,2	2184,99	53,27	-1,32									

Tabelle D: Zielgene von HGF in Versuch B

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	HGF	HGF SE	HGF A c-jun ⁺ A
1.	histone acetyltransferase	NM_007067	11143	434,18	5,57	299,51	5,94	-1,45	58.	zinc finger protein 261	NM_005096	9203	380,84	11,28	239,56	9,38	-1,59
2.	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	263,45	13,38	527,06	17,12	2	59.	keratin 13	NM_002274	3860	330,69	8,39	455,94	16,76	1,38
3.	Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)	U12707	7454	1017,11	11,28	770,68	6	-1,32	60.	adducin 1 (alpha)	NM_001119		419,17	5,52	309,02	11,25	-1,36
4.	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	BC003621	3192	295,42	20,87	428,29	16,54	1,45	61.	midline 2	NM_012216	11043	348,87	14,79	243,61	11,7	-1,43
5.	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta, 150/170kD)	BE614908	8661	517,42	22,33	678,22	11,88	1,31	62.	transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	821,49	13,17	1213,67	43,24	1,48
6.	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	BF594446	4170	373,93	11,26	584,31	9,73	1,56	63.	dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	414,51	13,05	652,18	28,93	1,57
7.	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	AL535380	694	681,53	11,19	896,73	26,85	1,32	64.	dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	215,1	6,55	439,47	14,49	2,04
8.	cytoskeleton-associated protein 4	NM_006825	10970	888,27	29,19	662,55	38,24	-1,34	65.	dual specificity phosphatase 6	BC005047	1848	193,13	12,89	315,1	16,56	1,63
9.	dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1843	841,31	14,03	1137,56	58,97	1,35	66.	core promoter element binding protein	AB017493	1316	405,87	10,76	579,1	35,1	1,43
10.	thioredoxin reductase 1	NM_003330	7296	370,16	14,41	490,39	18,69	1,32	67.	ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	M26700	7381	687,37	16,74	995,43	38,36	1,45
11.	prion protein (p27-30) (Creutzfeld-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	NM_000311	5621	2420,1	58,65	1696,29	78,88	-1,43	68.	connective tissue growth factor	M92934	1490	275,52	8,33	550,59	11,17	2
12.	claudin 4	NM_001305	1364	544,18	18,13	829,62	16,63	1,52	69.	mitogen inducible 2	Z24725	10979	360,9	9,16	517,46	18,94	1,43
13.	beta-2-microglobulin	NM_004048	567	2765,73	69,12	1936,78	169,81	-1,43	70.	Ewing sarcoma breakpoint region 1	BC004817	2130	396,81	7,87	288,7	23,51	-1,37
14.	low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	NM_000527	3949	627,89	10,74	886,58	29,71	1,41	71.	alpha-actinin-2-associated LIM protein	AF002280	27295	82,28	14,14	200,01	2,66	2,43
15.	ADP-ribosylation factor-like 7	BG435404	10123	305,46	13,6	190,73	5,9	-1,6	72.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	647,75	18,19	470,54	12,09	-1,38
16.	phosphoprotein regulated by mitogenic pathways	NM_025195	10221	293,85	20,67	427,12	16,23	1,45	73.	parathyroid hormone-like hormone	J03580	5744	604,14	11,3	906,2	15,86	1,5
17.	cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	1026	1292,18	36,93	1746,18	39,45	1,35	74.	interleukin 1 receptor-like 1	NM142701	9173	90,91	16,44	268,88	25,67	2,96
18.	casein kinase 1, epsilon	NM_001894	1454	309,31	5,78	506,52	17,92	1,64	75.	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	378,52	14,06	827,55	18,52	1,19
19.	TGFbeta inducible early growth response	NM_005655	7071	193,47	19,85	380,45	17,41	1,97	76.	A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	9590	301,41	13,37	498,05	30,43	1,65
20.	thymidylate synthetase	NM_001071	7298	334,45	11,51	434,82	12,88	1,3	77.	RNA helicase-related protein	AF078844	11325	295,01	8,64	163,18	11,16	-1,81
21.	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI738896	7128	580,77	19,25	785,75	23,33	1,35	78.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	1088,43	66,21	1527,78	26,29	1,4
22.	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	7128	691,84	15,05	901,49	24,77	1,3	79.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	192,27	5,39	86,16	19,73	-2,23
23.	cyclin G2	NM_004354	901	215,49	17,04	367,83	7,95	1,71	80.	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	636,37	16,81	333,28	40,74	-1,91
24.	four and a half LIM domains 2	NM_001450	2274	517,18	22,96	764,4	24,28	1,48	81.	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	AF003114	3491	503,57	16,48	704,89	30,79	1,4
25.	KIAA0429 gene product	NM_014751	9788	435,61	15,94	326,68	6,09	-1,33	82.	plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	590,94	22,24	1093,03	27,8	1,85
26.	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6 (17kD, B17)	NM_002493	4712	355,77	9,5	468,23	19,51	1,32	83.	programmed cell death 10	BC002506	11235	651,88	24,26	856,79	19,71	1,31
27.	epithelial V-like antigen 1	AF275945	10205	698,93	35,67	929,6	29,08	1,33	84.	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	367,93	4,49	250,42	3,77	-1,47
28.	KIAA0665 gene product	NM_014700	9727	334,63	11,88	229,58	5,78	-1,46	85.	parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1086,7	25,31	1438,19	63,02	1,32
29.	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	NM_005195	1052	235,31	16,58	348,43	15,74	1,48	86.	plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	632,09	37,19	1324,58	38,4	2,1
30.	dual specificity phosphatase 4	BC002671	1846	328,4	5,8	467,23	14,15	1,42	87.	zinc finger protein 36, C3H type-like 1	BG250310	677	219,14	10,74	325,03	11,4	1,48
31.	nuclear matrix protein p84	NM_005131	9884	663,95	19,32	505,89	11,57	-1,31	88.	Homo sapiens cDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122	AK026168		365,69	7,92	220,1	13,34	-1,66
32.	zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid- responsive)	NM_003422	7593	345,33	4,21	227,67	7,25	-1,52	89.	ras homolog gene family, member B	AI263909	388	232,74	13,74	399,92	13,84	1,72
33.	MAX binding protein	NM_020310	4335	147,81	12,43	281,92	13,28	1,91	90.	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	AL564683	1051	538,04	27,16	750,79	21,44	1,4
34.	phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	AI857639	5366	272,99	10,98	429,03	12,66	1,57	91.	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	AA502643	7531	1070,16	30,48	725,77	55,25	-1,47
35.	Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	AA488672	8609	224,58	7,55	371,19	9,77	1,65	92.	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA749101	8519	989,55	26,28	760,9	10,59	-1,3
36.	FOS-like antigen-1	BG251266	8061	386,38	10,43	540,95	11,79	1,4	93.	ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	519,22	5,77	397,1	13,32	-1,31
37.	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	4312	439,23	13,43	646,41	24,08	1,47	94.	tr75d05.x1 NC1 CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2224137 3' similar to contains Alu repetitive element	AI590053		338,8	10,27	439,33	8,41	1,3
38.	neuronal protein	NM_013259	29114	137,13	14,35	340,83	11,29	2,49	95.	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)	X86428	5524	462,18	9,66	345,81	6,76	-1,34
39.	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	5743	826,61	30,04	1646,76	51,48	1,99	96.	Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		458,83	8,63	651,67	11,98	1,42
40.	Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	158,37	7,79	318,05	6,37	2,01	97.	IBR domain containing 3	AL031602		2165,13	44,27	1638,45	40,72	-1,32
41.	Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	308,48	10,21	581,17	10,62	1,88	98.	proline-rich protein BstN1 subfamily 4	X07882		559,43	10,69	415,94	12,98	-1,34
42.	protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	NM_002846	5798	120,47	8,95	255,53	17,52	2,12	99.	pM5 protein	AI512687	23420	948,34	26,05	721,29	32,71	-1,31
43.	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	NM_012323	23764	216,5	11,2	333,35	15,52	1,54	100.	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AA576961	22822	610,1	20,27	905,6	44,01	1,48
44.	amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	374	2590,96	94,62	3875,85	131,66	1,5	101.	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_007350	22822	396,62	9,37	579,7	15,4	1,46
45.	protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	945,88	21,21	676,45	7,01	-1,4	102.	likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60685	211,57	16,44	343,03	6,08	1,62
46.	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	145,57	7,63	391,65	12,27	2,69	103.	chromosome 11 open reading frame 15	NM_020644	56674	582,52	16,13	433,1	21,72	-1,35
47.	bone morphogenetic protein 1	NM_001199	649	343,31	6,54	225,6	7,3	-1,52	104.	A20-binding inhibitor of NF-kappaB activation-2	NM_024309	79155	820,25	15,83	595,22	16,41	-1,38
48.	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	343,32	18,04	478,53	19	1,39	105.	type 1 transmembrane receptor (seizure-related protein)	NM_012410	26470	285,19	8,94	173,79	2,81	-1,64
49.	epiregulin	NM_001432	2069	568,89	17,87	796,52	20,95	1,4	106.	malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	212,4	12,98	104,41	5,87	-2,03
50.	tuftein 1	NM_020127	7286	480,17	25,46	758,39	24,1	1,58	107.	glycolipid transfer protein	NM_016433	51228	454,02	16,23	597,02	13,31	1,31
51.	parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	560,78	16,86	838,04	24,5	1,49	108.	RAB38, member RAS oncogene family	NM_022337	23682	1106,24	33,95	835,66	31,41	-1,32
52.	forkhead box D1	NM_004472	2297	239,89	10,64	364,6	14,69	1,52	109.	hypothetical protein FLJ21870	NM_023016	65124	343,32	13,46	480,57	18,33	1,4
53.	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	1788,6	76,47	1175,48	31,57	-1,52	110.	hypothetical protein FLJ20186	NM_017702	54849	493,41	11,39	372,06	20,38	-1,33
54.	bone morphogenetic protein 1	NM_006128	649	425,61	15,8	261,62	18,13	-1,63	111.	hypothetical protein FLJ13841	NM_024702	79755	338	4,74	195,98	6,73	-1,72
55.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	665,53	23,46	502,71	18,86	-1,32	112.	mucin 16	NM_024690	94025	211,86	7,93	51,2	10,27	2,4
56.	transferin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	698,77	9,91	1079,13	21,81	1,54	113.	hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	84,31	13,65	185,55	6,32	-1,12
57.	laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa))	NM_018891	3918	241,38	9,02	367,43	11,53	1,52	114.	Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		1293,65	79,81	748,46	33,38	-1,73
									115.	AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		261,57	11,38	383,14	33,38	1,46
									116.	AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		645,09	11,77	844,63	14,02	1,31
									117.	serologically defined breast cancer antigen NY-BR-20	AA886335	91860	350,5	6,58	237,01	5,92	-1,48
									118.	hypothetical protein	AK023069	51531	422,67	4,25	299,01	12,4	-1,41

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A
1.	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	NM_016587	11335	580.74	9.59	413.3	11.89	-1.41	55.	acidic protein rich in leucines	NM_006041	10541	1082.15	14.47	804.49	10.78	-1.35
2.	hypothetical protein	U69190	54555	335.55	5.21	458.62	14.6	1.37	56.	epithelial membrane protein 1	NM_001423	2012	2074.69	88.32	2741.01	54.46	1.32
3.	KIA0615 gene product	AB014515	9683	315.36	7.58	472.5	17.99	1.5	57.	general transcription factor IIIA	NM_002097	2971	421.14	15.28	303.69	12.07	-1.39
4.	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	263.45	13.38	559.12	11.06	2.12	58.	glutathione peroxidase 3 (plasma)	NM_002084	2878	244.86	7.37	139.66	9.87	-1.75
5.	peroxisome proliferative activated receptor, delta	L07592	5467	733.5	26.77	1030.01	19.52	1.4	59.	heat shock protein 75	NM_016292	10131	442.58	8.66	332.99	7.96	-1.33
6.	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	M60278	1839	752.71	19.21	1144.82	20.23	1.52	60.	claudin 4	NM_001305	1364	544.18	18.13	879.39	26.07	1.62
7.	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	L10343	5266	5530.99	115.24	7390.73	122	1.34	61.	aminopeptidase puromycin sensitive	AW055008	9520	293.69	6.16	434.52	6.54	1.48
8.	hypothetical protein FLJ20116	AA469071	55612	1160.57	30.78	1722.28	33.51	1.48	62.	aminopeptidase puromycin sensitive	AJ132583	9520	265.01	12.58	383.87	9.82	1.45
9.	hypothetical protein FLJ20258	AI219073	54869	421.25	10.83	572.87	10.41	1.36	63.	NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NM_000903	1728	358.02	8.98	240.25	8.78	-1.49
10.	nucleolin	NM_005381	4691	834.19	30.09	608.84	27.45	-1.37	64.	sequestosome 1	NM_003900	8878	238.53	9.38	387.65	14.91	1.63
11.	N-myc downstream regulated	NM_006096	10397	1010.16	52	2247.08	83.48	2.22	65.	dykeratosis congenita 1, dyskerin	NM_001363	1736	348.37	14.84	177.82	10.96	-1.96
12.	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	NM_002065	2752	286.75	8.86	665.84	22.09	2.32	66.	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	BC005020	10105	519.44	18.24	710.76	10.53	1.37
13.	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	NM_000918	5034	535.99	18.34	697.51	13.22	1.3	67.	peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	NM_005729	10105	738.4	22.52	1008.16	25	1.37
14.	translocase of outer mitochondrial membrane 20 (yeast) homolog	NM_014765	9804	393.91	8.97	286.56	4.07	-1.37	68.	nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	AI078167	4792	507.86	17.18	884.14	16.88	1.74
15.	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	NM_003340	7323	1681.92	52.05	2196	51.38	1.31	69.	chloride intracellular channel 4	NM_013943	25932	722.32	12.96	952.15	26.42	1.32
16.	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	491.33	13.54	665.78	14.56	1.36	70.	RuvB-like 1 (E. coli)	NM_003707	8607	365.38	9.37	214	5.25	-1.71
17.	LPS-induced TNF-alpha factor	AB034747	9516	461.95	14.16	618.26	26.2	1.34	71.	immediate early response 3	NM_003897	8870	1920.45	52.93	2829.02	46.42	1.47
18.	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	NM_005722	10097	593.06	31.11	878.53	29.31	1.48	72.	Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	AL039831	3716	328.84	14.35	459.44	9.81	1.4
19.	phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	5230	558.12	15.13	756.11	35.55	1.35	73.	gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)	NM_000165	2697	1053.43	34.68	790.88	7.54	-1.33
20.	phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	5230	1074.32	21.64	1484.06	54.29	1.38	74.	DNA (cytosine-5)-methyltransferase 1	NM_001379	1786	287.46	6.71	174.66	6.85	-1.65

Fortsetzung von Tabelle E: Zielgene von KGF in Versuch B

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁻	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A
112.	cyclin G2	AW134535	901	453,63	11,49	810,38	25,57	1,79	169.	small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	145,57	7,63	916,52	13,39	6,3
113.	cyclin G2	NM_004354	901	215,49	17,04	392,24	12,77	1,82	170.	plasminogen activator, urokinase	NM_002658	5328	1302,8	30,65	1958,16	40,13	1,5
114.	acidic 82 kDa protein mRNA	NM_014597	30836	471,63	22,38	345,69	12,93	-1,36	171.	2,5'-oligoadenylate synthetase 1 (40-46 kD)	NM_002534	4938	257,96	10,35	367,41	9,59	1,42
115.	claudin 7	NM_001307	1366	608,84	11,12	835,33	11,3	1,37	172.	E3 ubiquitin ligase SMURF2	AY014180	64750	408,4	9,43	529,44	18,72	1,3
116.	serine protease inhibitor, Kunitz type 1	NM_003710	6892	275,39	10,01	383,6	11,44	1,39	173.	aminolevulinic acid, synthase 1	NM_000688	211	232,84	20,63	368,29	7,22	1,58
117.	glutathione peroxidase 2 (gastrointestinal)	NM_002083	2877	472,21	10,56	297,87	9,36	-1,59	174.	matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	343,32	18,04	767,65	26,8	2,24
118.	interleukin 8	NM_000584	3576	1026,74	31,37	1854,13	59,21	1,81	175.	tufelin 1	NM_020127	7286	480,17	25,46	689,2	18,36	1,44
119.	CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	NM_001255	991	340,34	13,88	217,04	7,49	-1,57	176.	S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	NM_005621	6283	148,14	5,64	533,06	16,06	3,6
120.	HLF-1 responsive RTP801	NM_019058	54541	459,68	11,89	905,46	11,97	1,97	177.	S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1)	NM_002963	6278	2082,47	95,85	4482,05	65,7	2,15
121.	adrenomedullin	NM_001124	133	457,53	17,08	684,62	29,97	1,5	178.	H4 histone family, member G	NM_003542	8364	418,15	8,83	237,93	13,64	-1,76
122.	hexokinase 2	AI761561	3099	178,67	8,29	535,96	22,45	3	179.	neuromedin U	NM_006681	10874	299,71	13,24	165,72	7,44	-1,81
123.	T-cell leukemia translocation altered gene	NM_022171	6988	220,27	9,36	322,97	6,6	1,47	180.	parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	560,78	16,86	350,66	19,47	-1,6
124.	retinoic acid induced 3	NM_003979	9052	678,48	39,79	1270,29	24,74	1,87	181.	lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	1788,6	76,47	1142,68	52,45	-1,57
125.	cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	AL524035	983	248,05	5,12	147,46	4,69	-1,68	182.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	NM_003784	8710	921,14	16,77	1293,99	19,66	1,4
126.	enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV)	NM_000158	2632	180,35	3,71	291,62	6,19	1,62	183.	similar to yeast Upf3, variant A	AF318575	65110	80,23	11,81	229,69	20,46	2,86
127.	ladinin 1	NM_005558	3898	1120,52	25,94	761,19	13,41	-1,47	184.	heat shock 105kD	NM_006644	10808	603,36	7,68	421,64	12,87	-1,43
128.	MKP-1 like protein tyrosine phosphatase	NM_007026	11072	582,09	5,61	774,03	23,57	1,33	185.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	665,53	23,46	393,44	17,12	-1,69
129.	splicing factor, arginine/serine-rich 5	NM_006925	6430	567,94	27,79	786,31	24,41	1,38	186.	discoilin domain receptor family, member 1	NM_001954	780	666,7	14,22	917,01	8,23	1,38
130.	Down syndrome critical region gene 2	NM_003720	8624	303,46	5,38	188,02	4,85	-1,61	187.	Nef-associated factor 1	NM_006058	10318	503,52	9,41	987,59	21,27	1,96
131.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	NM_002970	6303	489,9	10,87	1011,52	17,82	2,06	188.	laminin, gamma 2 (nicotin (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa)	NM_018891	3918	241,38	9,02	365,67	10,69	1,51
132.	trophoblast glycoprotein	NM_006670	7162	472,87	15,6	766,96	24,06	1,62	189.	plakophilin 2	NM_004572	5318	215,99	3,61	326,56	10,79	1,51
133.	EphA2	NM_004431	1969	414,37	15,94	592,29	13,43	1,43	190.	nuclear receptor co-repressor 2	NM_006312	9612	215,08	9,16	328,47	9,41	1,53
134.	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	NM_002638	5266	6291,17	149,47	8710,24	158,99	1,38	191.	adenosine monophosphate deaminase (isoform E)	NM_000480	272	188,62	7,29	298,27	26,18	1,58
135.	laminin, alpha 3 (nicotin (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epiligrin)	NM_000227	3909	2984,17	91,98	4191,82	39,9	1,4	192.	peroxisome proliferator activated receptor, delta	NM_006238	5467	281,58	7,63	400,14	8,26	1,42
136.	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	BC005008	4680	601,02	26,25	1160,43	32,23	1,93	193.	sema domain, immunoglobulin domain (lg), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	NM_004263	10505	128,42	8,99	251,31	15	1,96
137.	secreted, (semaphorin) 3C	NM_006379	10512	691,5	20,43	944,92	24,49	1,37	194.	DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 21	NM_004728	9188	351,59	12,84	221,85	12,62	-1,58
138.	visinin-like 1	AF039555	7447	360,51	10,63	234,29	18,61	-1,54	195.	hypothetical protein FLJ20006	NM_017618	54782	202,54	5,77	316,11	5,39	1,56
139.	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1283,01	45,17	1973,98	38,71	1,54	196.	interferon regulatory factor 7	NM_004030	3665	522,32	7,37	750,69	6,48	1,44
140.	natural killer cell transcript 4	NM_004221	9235	131,01	4,25	241,35	7,32	1,84	197.	small proline-rich protein 2B	NM_006945	6701	4030,25	191,39	8224,61	279,23	2,04
141.	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	NM_003095	6636	532,68	15,59	408,15	8,86	-1,31	198.	CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	BG327863	934	1239,01	47,62	1648,11	27,06	1,33
142.	glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	NM_002061	2730	363,35	13,02	218,37	4,16	-1,66	199.	splicing factor, arginine/serine-rich 3	BC000914	6428	1524,53	48,56	1058,77	11,76	-1,44
143.	matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kD gelatinase, 92kD type IV collagenase)	NM_004994	4318	1368,9	61,71	2250,52	64,09	1,64	200.	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 (eta, 116kD)	U78525	8662	435,94	14,64	331,24	10,67	-1,32
144.	carbonic anhydrase XII	NM_001218	771	261	15,48	433,96	11,72	1,66	201.	glycyl-tRNA synthetase	D30658	2617	646,21	28,29	874,3	26,44	1,35
145.	translin-associated factor X	NM_005999	7257	83,91	10,31	187,12	14,68	2,23	202.	potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	Z97056	3761	574,64	21,49	760,79	22,4	1,32
146.	mitochondrial ribosomal protein S12	NM_021107	6183	319,89	10,16	207,8	7,75	-1,54	203.	5-aminimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	D89976	471	329,44	10,62	223,31	14,36	-1,48
147.	S100 calcium binding protein P	NM_005980	6286	555,86	18,96	942,5	17,12	1,7	204.	microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3	AF183417	81631	262,69	12,8	461,4	15,03	1,76
148.	mitochondrial ribosomal protein 63	BF303597	78988	598,68	19,39	452,9	14,33	-1,32	205.	mitochondrial ribosomal protein L3	BC003375	11222	716,68	28,8	461	10,72	-1,55
149.	monoamine oxidase A	NM_000240	4128	280,27	9,41	389,49	10,79	1,39	206.	signal recognition particle 72kD	BE856385	6731	597,1	18,36	448,6	12,57	-1,33
150.	putative dimethyladenosine transferase	NM_014473	27292	312,65	10,4	209,63	13,54	-1,49	207.	complement component 1, q subcomponent binding protein	L04636	708	577,88	16,94	431,3	10,38	-1,34
151.	GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	2919	403,28	11,89	601,21	14,85	1,49	208.	chromosome 3 open reading frame 4	AF161522	56650	206,81	9,82	318,37	12,31	1,54
152.	matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	4312	439,23	13,43	766,54	34,42	1,75	209.	dUTP pyrophosphatase	U62891	1854	719,16	24,31	516,78	7,62	-1,39
153.	U6 snRNA-associated Sm-like protein Lsm7	NM_016199	51690	444,47	17,25	326,47	10,49	-1,36	210.	similar to MRJ gene for a member of the DNAJ protein family (H. sapiens)	BC002446	136442	185,8	5,17	335,84	10,34	1,81
154.	KIA0615 gene product	NM_014664	9683	238,17	5,3	353,56	17,09	1,48	211.	NS1-associated protein 1	AF037448	10492	306,74	12,19	196,62	7,18	-1,56
155.	potassium channel, subfamily K, member 1 (TWIK-1)	NM_002245	3775	335,62	8,06	494,06	23,45	1,47	212.	proline-rich protein with nuclear targeting signal	AF279899	10957	188,85	8,88	342,84	15,78	1,82
156.	prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	5743	826,61	30,04	1105,01	36,95	1,34	213.	interferon-related developmental regulator 2	BC001327	7866	289,02	13,97	184,53	11,85	-1,57
157.	KIA0938 protein	NM_014903	22840	231,17	4,99	356,33	8,4	1,54	214.	5'-nucleotidase (purine), cytosolic type B	BC001595	22978	222,76	9,81	326,77	11,33	1,47
158.	folistatin	NM_013409	10468	1494,27	40,22	944,07	29,62	-1,58	215.	C2f protein	U72514	10436	334,58	16,28	226,19	9,04	-1,48
159.	heparin-binding growth factor binding protein	NM_005130	9982	4091,88	60,1	2956,67	64,87	-1,38	216.	laminin, beta 3 (nicotin (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	L25541	3914	1363,64	41,57	2022,86	36,37	1,48
160.	heparin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	NM_002203	3673	354,27	17,94	533,79	17,71	1,51	217.	UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	S73498	6675	515,88	27,47	715,11	32,31	1,39
161.	vaccinia related kinase 2	NM_006296	7444	314,57	10,26	417,27	12,75	1,33	218.	smoothelin	AF064238	6525	371,42	13,61	483,46	7,5	1,3
162.	heat shock 10kD protein 1 (chaperonin 10)	NM_002157	3336	775,56	17,1	565,18	10,95	-1,37	219.	HIV-1 Tat interactive protein 2, 30 kDa	BC002439	10553	368,41	8,34	253,82	4,73	-1,45
163.	a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	558,36	14,73	766,37	15,15	1,37	220.	thioredoxin domain-containing	AL080080	81542	372,16	8,69	269,12	11,12	-1,38
164.	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	NM_012323	23764	216,5	11,2	355,39	14	1,64	221.	carboxylesterase 2 (intestine, liver)	BF033242	8824	770,12	20,53	531,51	6,96	-1,45
165.	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	NM_002068	2769	292,07	13,25	423,8	19,36	1,45	222.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	U19556	6317	1095,1	44,34	1564	35,82	1,43
166.	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kD	NM_003866	8821	171,74	4,91	293,12	3,96	1,71	223.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	647,75	18,19	911,73	11,47	1,41
167.	interleukin 1 receptor, type II	NM_004633	7850	1492,16	72,4	3019,39	63,82	2,02	224.	ribonucleotide reductase M2 polypeptide	BC001886	6241	677,78	24,17	444,43	15,53	-1,53
168.	H2A histone family, member X	NM_002105	3014	323,12	6,7	197,05	10,89	-1,64	225.	methionyl aminopeptidase 2	U13261	10988	580,68	15,45	436,97	12,8	-1,33

Fortsetzung von Tabelle E: Zielgene von KGF in Versuch B

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A	Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A
226.	dUTP pyrophosphatase	U90223	1854	450,91	22,83	318,27	13,88	-1,42	280.	lipocalin 2 (oncogene 24p3)	NM_005564	3934	267,19	13,11	1341,44	11,26	5,02
227.	neutrophil cytosolic factor 2 (65kD, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	BC001606	4688	171,64	5,78	393,11	10,69	2,29	281.	interleukin 1 receptor antagonist	U65590	3557	3098,48	66,46	4368,78	95,98	1,41
228.	JTV1 gene	AI928526	7965	390,74	16,46	242,76	12,8	-1,61	282.	interleukin 1 receptor antagonist	AW083357	3557	1378,96	29,35	2200,21	37,33	1,6
229.	JAK binding protein	AB005043	8651	136,5	8,67	261,92	5,1	-1,92	283.	ras homolog gene family, member E	BG054844	390	715,32	20,4	954,14	32,71	1,33
230.	APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme)	M80261	328	387,67	9,09	283,96	11,32	-1,37	284.	cysteinyl-HRNA synthetase	AI769685	833	563,02	16,1	779,93	9,1	1,39
231.	PAI-1 mRNA-binding protein	AF151813	26135	575,31	21,79	425,49	12,14	-1,35	285.	Rho-specific guanine nucleotide exchange factor p114	AB011093	23370	339,98	13,19	481,59	14,09	1,42
232.	insulin-like growth factor binding protein 3	M31159	3486	548,16	13,57	1659,24	27,74	3,03	286.	wg9h08.x1 NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2479263 3							
233.	interleukin 1, alpha	M15329	3552	1573,43	81,16	2693,11	70,83	1,71	287.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	AI970157		422,38	9,73	221,9	3,77	-1,9
234.	regulator of G-protein signalling 20	AF074979	8601	456,32	6,77	305,5	8,21	-1,49	288.	RAR (RAS like GTPASE)	BE965869	57799	214,9	9,71	92,23	22,48	-2,33
235.	nuclear receptor coactivator 1	U59302	8648	133,24	12,09	287,05	10,32	2,15	289.	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	BE965369	2150	438,16	7,98	305,19	7,56	-1,44
236.	RAB6C, member RAS oncogene family	AL136727	84084	501,05	13,17	691,73	17,45	1,38	290.	carboxylesterase 2 (intestine, liver)	AW157619	8824	786,66	37,95	564,33	8,12	-1,39
237.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	940,72	18,69	1482,23	45,01	1,58	291.	lactate dehydrogenase B	BE042354	3945	1796,47	39,4	1372,48	28,12	-1,31
238.	inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	378,52	14,06	720,44	13,8	1,9	292.	HSPC022 protein	BE138888	28963	419,96	11,44	576,3	18,02	1,36
239.	vascular endothelial growth factor	AF022375	7422	437,98	11,42	637,02	25,83	1,45	293.	mucin 1, transmembrane	AI610869	4582	163,51	7,93	288,66	13,09	1,77
240.	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	AF226990	3135	687,7	13,34	992,98	23,73	1,44	294.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	BE971383	6303	513,53	16,96	976,7	29,27	1,9
241.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	1088,43	66,21	2149,54	63,52	1,97	295.	hypothetical protein	BE314601	51491	426,26	17,06	302,98	16,68	-1,41
242.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	M19156	3858	827,36	23,25	522,2	32,91	-1,58	296.	putative integral membrane transporter	T15777	55353	525,05	14,78	382,47	10,12	-1,37
243.	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	636,37	16,81	281,27	30,19	-2,26	297.	splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)	BF033354	6432	787,46	29,76	454,66	13,61	-1,73
244.	IQ motif containing GTPase activating protein 1	D29640	8826	363,44	9,38	474,7	17,41	1,31	298.	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	BF752277	164	339,29	8,92	473,2	16,64	1,39
245.	plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	590,94	22,24	965,91	18,93	1,63	299.	hematopoietic PBX-interacting protein	AI935162	57326	308,88	5,25	440,37	13,06	1,43
246.	Homo sapiens phorbol I	U03891		637,21	9,71	1413,45	14,8	2,22	300.	ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	519,22	5,77	348,73	9,46	-1,49
247.	jumping translocation breakpoint	BC004239	10899	870,09	10	657,23	14,27	-1,32	301.	complement component 1, q subcomponent binding protein	AI151801	708	518,9	34,11	339,45	19,9	-1,53
248.	CD47 antigen (Rn-related antigen, integrin-associated signal transducer)	Z25521	961	448,7	20,78	605,29	16,67	1,35	302.	H2A histone family, member O	AI313324	8337	772,1	15,18	1022,58	28,54	1,32
249.	interleukin 1 receptor, type II	U64094	7850	997,24	29,22	2124,55	38,35	2,13	303.	retinoic acid receptor, alpha	T91506	5914	198,58	8,68	310,59	12,74	1,56
250.	interleukin 8	AF043337	3576	357,53	8,4	753,08	18,21	2,11	304.	heat shock 90kD protein 1, beta	AI218219	3326	1425,95	59,83	1039,46	27,42	-1,37
251.	HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	M90684	3135	800,46	17,27	1127,37	31,32	1,41	305.	aldolase A, fructose-bisphosphate	AK026577	226	2797,17	103,59	3653,37	59,22	1,31
252.	cyclin G2	L49506	901	263,35	6,65	467,37	15,68	1,77	306.	hypothetical protein MGC14376	AF070569	84981	213,28	9,6	314,5	15,61	1,47
253.	casein kinase 2, beta polypeptide	M30448	1460	725,88	27,17	453,44	15,52	-1,6	307.	phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	517,58	25,94	824,57	17,03	1,59
254.	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	M18728	4680	650,11	22,91	1138,72	35,87	1,75	308.	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	AL161952	2752	372,89	11,95	830,01	17,03	2,23
255.	plasminogen activator, urokinase	K03226	5328	1114,1	38,44	1688,65	43,75	1,52	309.	translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	AK023063	10440	611,52	15,84	458,98	21,8	-1,33
256.	enolase 1, (alpha)	BC005884	2023	237,73	6,19	341,41	13,02	1,44	310.	superoxide dismutase 2, mitochondrial	W46388	6648	161,47	6,31	658,36	13,05	4,08
257.	U6 snRNA-associated Sm-like protein	BC005938	23658	297,25	11,37	193,14	4,72	-1,54	311.	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	AF721177	8301	254,23	9,41	390,32	13,41	1,54
258.	parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1086,7	25,31	638,64	14,73	-1,7	312.	tr75d05.x1 NCI_CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2224137 3 similar to contains Alu repetitive element							
259.	Slath-interacting protein	BC005975	27101	391,55	5,15	216,37	11,78	-1,81	313.	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	AI590053		338,8	10,27	506,19	10,24	1,49
260.	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	BC005978	3838	797,74	31,26	561,15	26,41	-1,42	314.	adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	AV722190	8301	244,88	5,66	355,24	10,54	1,45
261.	decorin	AF138303	1634	460,77	7,82	597,37	15,03	1,3	315.	ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	AL050025	164	347,46	10,97	485,83	13,95	1,4
262.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	AB046400	6317	77,8	6,01	424,48	4,56	5,46	316.	hypothetical protein MGC14376	X63575	491	46,78	16,1	208,08	14,57	4,45
263.	plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	632,09	37,19	1040,59	22,32	1,65	317.	Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		458,83	8,63	650,49	9,87	1,42
264.	nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	D21262	9221	349,58	16,1	193,36	9,44	-1,81	318.	interleukin 1 receptor antagonist	BE563442	3557	2269,39	55,13	3356,55	47,3	1,48
265.	leucine-rich PPR-motif containing	AI653608	10128	300,35	6,37	193,79	6,8	-1,55	319.	interleukin 1 receptor antagonist	BE563442		248,61	8,63	364,02	10,73	1,46
266.	omo sapiens cDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122	AK026168		365,69	7,92	494,21	19,91	1,35	320.	similar to prothymosin alpha	AF257099		767,09	14,75	582,16	26,47	-1,32
267.	ras homolog gene family, member B	AI263909	388	232,74	13,74	363,2	15,93	1,56	321.	superoxide dismutase 2, mitochondrial	X15132	6648	52,31	2,8	242,68	3,73	4,64
268.	insulin-like growth factor binding protein 3	BF340228	3486	224,92	13,39	659,42	25,41	2,93	322.	proline-rich protein BstNI subfamily 4	X07882		559,43	10,69	431,67	11,02	-1,3
269.	Homo sapiens mRNA; cDNA DKFZp564F053 (from clone DKFZp564F053)	AL049265		401,36	9,63	607,69	8,74	1,51	323.	small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	AI130972	6627	454,22	15,85	334,69	7,92	-1,36
270.	homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	AL031781	9444	364,74	21,47	508,67	17,98	1,39		homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	AF217990	9709	306,04	9,91	528,34	12,66	1,73
271.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	NM_030666	1992	830,87	20,63	1199,29	27,65	1,44	324.	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	U08626	2752	300,27	8,76	666,25	13,8	2,22
272.	FK506 binding protein 1A (12kD)	BC001002	2280	976,29	30,43	692,15	17,47	-1,41	325.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 13	AJ001698	5275	721,44	20,85	410,56	8,18	-1,76
273.	myosin IB	BF432550	4430	766,21	30,19	1086,26	31,53	1,42	326.	hypothetical protein [Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H]	S81916		1989,13	42,06	2634,61	38	1,32
274.	myosin IB	BF215996	4430	944,06	28,88	1247,44	23,48	1,32	327.	major histocompatibility complex, class I, J (pseudogene)	M80469	3137	413,18	14,9	551,14	11,41	1,33
275.	similar to HYPOTHETICAL 34.0 KDA PROTEIN ZK795.3 IN CHROMOSOME IV	BE747342	92856	308,16	7,69	201,5	11,1	-1,53	328.	chloride channel, calcium activated, family member 2	BF003134	9635	468,52	18,5	330,16	22,48	-1,42
276.	z150c12.s1 Soares_pregnant_uterus_NbHPU Homo sapiens cDNA clone IMAGE:505366 3'	AA156240		194,85	12,36	348,6	13,26	1,79	329.	z150c08.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:741710 3' similar to contains Alu repetitive element							
277.	neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like	AI357376	23327	272,51	15,59	453,61	14,22	1,66	330.	PAI-1 mRNA-binding protein	AA401963		285,2	7,91	440,47	9,56	1,54
278.	fibronectin 1	X02761	2335	836,68	15,79	1158,3	24,82	1,38	331.	PAI-1 mRNA-binding protein	AF131807	26135	1227,91	51,43	882,53	23,18	-1,39
279.	phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	AL135735	8301	445,67	16,98	611,69	13,97	1,37	332.	PP1201 protein	NM_015640	26135	652,27	19,69	431,67	17,08	-1,51
									333.	pre-B-cell colony-enhancing factor	NM_022152	64114	608,78	14,66	795,99	18,16	1,31
									334.	pre-B-cell colony-enhancing factor	BF575514	10135	147,35	5,82	304,56	16,42	2,07
									335.	zinc finger protein 216	NM_005746	10135	616,72	4,15	881,41	21,95	1,43
									336.	CGI-127 protein	AW471220	7763	503,49	20,59	742,79	21,09	1,48
											NM_016061	51646	229,98	10,43	393,13	9,95	1,71



Fortsetzung von Tabelle E: Zielgene von KGF in Versuch B

Anhang 124

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A	Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ⁺	c-jun ⁺ SE	KGF	KGF SE	KGF A c-jun ⁺ A
337. ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	NM_003344	7328	373,84	18,49	505,24	19,12	1,35	397. HSPC133 protein	AF201938	29081	516,47	14,25	396,53	10,22	-1,3
338. HSPC028 protein	NM_014038	28969	355,23	15,92	220,52	10,88	-1,61	398. protein associated with PRK1	AL136598	54469	289,62	5,12	398,78	13,44	1,38
339. chromatin-specific transcription elongation factor, 140 kDa subunit	NM_007192	11198	342,1	10,52	233,31	9,61	-1,47	399. hypothetical protein FLJ20258	AF282167	54869	225,67	7,03	330,96	15,33	1,47
340. TRK-fused gene	NM_006070	10342	822,6	27,25	1136,83	45,9	1,38	400. hypothetical protein FLJ20258	BC004907	54869	173,08	8,77	274,53	7,18	1,59
341. putative nucleotide binding protein, estradiol-induced	NM_014366	26354	255,46	7,65	149,86	11,07	-1,7	401. ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	AV757537	2004	369,29	17,09	567,81	24,77	1,54
342. MO25 protein	NM_016289	51719	1206,54	30,21	1653,77	43,33	1,37	402. AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		645,09	11,77	874,44	4,96	1,36
343. mitochondrial ribosomal protein L42	BE782148	28977	442,06	12,01	313,78	8,81	-1,41	403. Kruppel-like factor 4 (gut)	BF514079	9314	438,02	17,29	631,93	19,38	1,44
344. nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NM_014380	27018	905,73	34,89	678,49	15,69	-1,33	404. heat shock 70kD protein 8	AA704004	3312	3965,39	96,66	2920,29	125,67	-1,36
345. CGI-44 protein; sulfide dehydrogenase like (yeast)	NM_021199	58472	1409,58	25,07	1869,23	26,7	1,33	405. oy31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		75,46	23,6	404,36	18,06	5,36
346. uncharacterized hypothalamus protein HSMNP1	NM_018478	55861	300,59	4,5	420,39	13,33	1,4	406. ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	AI829920	7328	368,56	10,66	594,14	23,03	1,61
347. ADP-ribosylation factor-like 5	NM_012097	26225	404,48	6,7	286,12	12,56	-1,41	407. DKFZP586L0724 protein	AU158148	25926	301,5	7,46	198	7,82	-1,52
348. G protein-coupled receptor kinase 7	NM_017572	2872	353,31	12,44	901,12	17,62	2,55	408. H1 histone family, member 4	AL353759	3008	351,98	10,39	468,39	16,34	1,33
349. hypothetical protein DKFZp761H221	NM_017601	54772	813,97	19,82	604,99	13,48	-1,35	409. Rac GTPase activating protein 1	AU153848	29127	253,78	7,69	152,78	3,32	-1,66
350. G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	424,52	9,07	314,07	7,75	-1,35								
351. G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	571,29	11,97	367,54	8,17	-1,55								
352. H2A histone family, member O	NM_003516	8337	464,09	11,58	606,61	13,92	1,31								
353. translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)	NM_012459	26521	991,93	30,87	733,99	25,39	-1,35								
354. hypothetical protein FLJ22969	NM_022842	64866	619,54	6,83	807,78	11,86	1,3								
355. ERO1-like (S. cerevisiae)	NM_014584	30001	205,41	7,09	637,4	5,26	3,1								
356. hypothetical protein MGC5585	NM_024057	79023	338,11	11,76	211,35	8,62	-1,6								
357. hypothetical protein PP5395	NM_021732	60370	365,6	11,85	602,1	16,63	1,65								
358. pseudouridylyl synthase 1	NM_025215	80324	79,08	25,68	435,14	28,39	5,5								
359. Huntingtin interacting protein K	NM_016400	25764	534,27	10,47	404,91	6,1	-1,32								
360. platelet derived growth factor C	NM_016205	56034	224,41	16,25	330,82	10,21	1,47								
361. hypothetical protein FLJ20258	NM_017729	54869	292,18	9,21	403,66	9,04	1,38								
362. hypothetical protein FLJ20116	NM_017671	55612	1489,29	41,55	2086,53	66,62	1,4								
363. hypothetical protein FLJ23231	NM_025079	80149	138,06	4,51	295,24	6,04	2,14								
364. hypothetical protein	NM_016629	51323	560,78	21,05	385,33	7,7	-1,46								
365. malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	212,4	12,98	107,17	5,93	-1,98								
366. small proline-rich protein 3	NM_005416	6707	364,25	16,73	547,48	12,75	1,5								
367. hypothetical protein FLJ10901	NM_018265	55765	331,71	15,81	442,52	12,34	1,33								
368. CGI-115 protein	NM_016052	51018	180,42	5,01	73,8	7,34	-2,44								
369. RAB38, member RAS oncogene family	NM_022337	23682	1106,24	33,95	788,46	19,57	-1,4								
370. cysteine-rich hydrophobic domain 2	NM_012110	26511	329,88	9,38	451,05	18,5	1,37								
371. hypothetical protein FLJ21870	NM_023016	65124	343,32	13,46	445,04	11,87	1,3								
372. Rh type C glycoprotein	NM_016321	51458	555,92	19,84	1441,27	28,56	2,59								
373. epithelial protein up-regulated in carcinoma, membrane associated protein 17	NM_005764	10158	99,5	5,81	272,27	10,24	2,74								
374. hypothetical protein FLJ10116	NM_018000	55686	401,69	35	642,32	13,83	1,6								
375. hypothetical protein FLJ22622	NM_025151	80223	268,97	9,58	375,11	11,31	1,39								
376. hypothetical protein FLJ22792	NM_024921	79983	184,15	7,89	304,43	14,33	1,65								
377. solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	NM_007231	11254	726,26	14,12	1729,82	52,85	2,38								
378. hypothetical protein MGC10796	NM_024508	79413	827,24	16,26	1226,2	20	1,48								
379. ets homologous factor	NM_012153	26298	181,84	10,91	291,25	6,93	1,6								
380. interleukin 23, alpha subunit p19	NM_016584	51561	110,49	12,7	381,78	44,58	3,46								
381. mucin 16	NM_024690	94025	211,86	7,93	91,32	3,36	-2,32								
382. cytochrome b5 reductase b5R.2	NM_016229	51700	786,13	22,69	1056,24	25,31	1,34								
383. hypothetical protein FLJ20207	NM_017711	54857	247,09	9,48	356,19	16,96	1,44								
384. interleukin-1 homolog 1	NM_019618	56300	1127,9	42,29	3167,36	42,6	2,81								
385. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	84,31	13,65	198,92	4,06	2,36								
386. NICE-1 protein	NM_019060	54544	1729,7	73,76	2861,85	138,74	1,65								
387. E2IG2 protein	NM_016565	51287	333,5	8,94	203,65	7,87	-1,64								
388. transcription factor BMAL2	NM_020183	56938	301,99	6,32	455,91	9,45	1,51								
389. small proline-rich protein 2C	NM_006518	6702	33,18	5,98	140,6	6,75	4,24								
390. 60S acidic ribosomal protein PO	NM_016183	51154	296,93	6,49	173,77	5,38	-1,71								
391. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	625,48	16,18	461,17	16,15	-1,36								
392. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		1293,65	79,81	711,71	39,5	-1,82								
393. hypothetical protein MGC5618	BF575213	79099	178,44	7,32	816,05	18,35	4,57								
394. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	AL132665	665	141,27	5,78	371,47	10,5	2,63								
395. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	AF060922	665	330,2	9,92	835,55	19,16	2,53								
396. leucine carboxyl methyltransferase	BC001214	51451	240,51	16,84	370,71	7,57	1,54								



Tabelle F: Zielgene von GM-CSF in Versuch B

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	c-jun ^{-/-}	c-jun ^{+/-} SE	GM-CSF	GM-CSF SE	GM-CSF A c-jun ^{+/-} A
1. basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	NM_003670	8553	427,28	10,58	309,15	9,32	-1,38
2. Notch homolog 2 (Drosophila)	AA291203	4853	440,48	19,29	575,21	9,38	1,31
3. RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	NM_002890	5921	974,54	31,46	749,01	14,43	-1,3
4. STAT induced STAT inhibitor-2	AB004903	8835	115,25	5,9	216,94	21,25	1,88
5. splicing factor, arginine/serine-rich 5	NM_006925	6430	567,94	27,79	754,76	26,03	1,33
6. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1283,01	45,17	976,69	15,32	-1,31
7. development and differentiation enhancing factor 2	NM_003887	8853	346,63	14,56	216,14	15,77	-1,6
8. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	698,77	9,91	909,53	14,71	1,3
9. gap junction protein, alpha 7, 45kD (connexin 45)	NM_005497	10052	138,64	7,21	370,35	18,98	2,67
10. voltage-dependent anion channel 3	U90943	7419	393,81	42,77	593,94	10,83	1,51
11. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	1088,43	66,21	1685,73	52,5	1,55
12. inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	636,37	16,81	426,79	30,24	1,49
13. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		637,21	9,71	431,57	11,09	-1,48
14. folate receptor 1 (adult)	AF000381		692,63	21,8	518,21	17,78	-1,34
15. carboxylesterase 2 (intestine, liver)	AW157619	8824	786,66	37,95	586,5	16,07	-1,34
16. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	517,58	25,94	722,33	17,5	1,4
17. Homo sapiens folate binding protein	AK023843		358,74	9,74	495,11	11,75	1,38
18. polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J (13.3kD)	AW402635	5439	378,71	21,04	246,98	11,08	-1,53
19. UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1	NM_020120	56886	201,73	5,72	325,53	12,55	1,61
20. malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	212,4	12,98	108,99	2,75	-1,95
21. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		1293,65	79,81	864,33	30,13	1,5

H **Tabelle G: Zielgene von HGF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind**

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B
1. histone acetyltransferase	NM_007067	11143	-1,4	-1,45
2. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	1,54	2
3. dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1843	1,36	1,35
4. low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	NM_000527	3949	1,55	1,41
5. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI738896	7128	1,62	1,35
6. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	7128	1,64	1,3
7. dual specificity phosphatase 4	BC002671	1846	1,35	1,42
8. FOS-like antigen-1	BG251266	8061	1,33	1,4
9. neuronal protein	NM_013259	29114	2	2,49
10. Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	1,3	1,88
11. protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	-1,42	-1,4
12. small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	1,55	2,69
13. matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	1,63	1,39
14. parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	1,41	1,49
15. lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	-1,43	-1,52
16. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,45	-1,32
17. keratin 13	NM_002274	3860	1,7	1,38
18. midline 2	NM_012216	11043	-1,48	-1,43
19. dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	1,4	2,04
20. connective tissue growth factor	M92934	1490	1,8	2
21. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,36	-1,38
22. parathyroid hormone-like hormone	J03580	5744	1,37	1,5
23. inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	1,64	2,19
24. A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	9590	2	1,65
25. plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	1,92	1,85
26. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,47	-1,47
27. parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1,53	1,32
28. plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	1,62	2,1
29. ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	-1,47	-1,31
30. protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)	X86428	5524	-1,31	-1,34
31. IBR domain containing 3	AL031602		-1,34	-1,32
32. glycolipid transfer protein	NM_016433	51228	-1,4	1,31
33. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-2,04	-1,73
34. AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		1,35	1,31
35. hypothetical protein	AK023069	51531	-1,44	-1,41

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.

L **Tabelle H: Zielgene von KGF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind**

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
1. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,32	1,36
2. baculoviral IAP repeat-containing 2	NM_001166	329	1,6	1,33
3. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI738896	7128	1,32	1,86
4. interleukin 8	NM_000584	3576	1,45	1,81
5. S100 calcium binding protein P	NM_005980	6286	-1,33	1,7
6. a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	1,3	1,37
7. lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	-1,47	-1,57
8. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,37	1,41
9. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,35	1,58
10. inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	7,07	-2,26
11. Homo sapiens PNAS-20	AF274945		2,54	7,51
12. lipocalin 2 (oncogene 24p3)	NM_005564	3934	-1,32	5,02
13. ras homolog gene family, member E	BG054844	390	1,41	1,33
14. coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	BE965369	2150	1,31	-1,44
15. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,73	1,59
16. u53c08.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:741710 3' similar to contains Alu repetitive element	AA401963		1,64	1,54
17. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	-1,76	2,36
18. oy31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-2,86	5,36
19. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,32	1,36

G **Tabelle I: Zielgene von GM-CSF, die in Versuch A und B aussagekräftig reguliert sind**

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
1. inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	3,4	1,49
2. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,39	1,4
3. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		1,43	1,5

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinozyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinozyten (HGF), ^{KGF}Keratinozyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinozyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten als Referenzwerte.



Tabelle J: Zielgene von HGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B
1. PRP8 pre-mRNA processing factor 8 homolog (yeast)	NM_006445	10594	1,42	1,04	57. oncogene homolog, avian)				
2. histone acetyltransferase	NM_007067	11143	-1,4	-1,45	58. spermine synthase	NM_004595	6611	1,33	1,05
3. sorting nexin 3, nuclear receptor subfamily 2, group E, member 1	AL078596		-1,3	1,05	59. low density lipoprotein receptor (familial hypercholesterolemia)	NM_000527	3949	1,55	1,41
4. H3 histone, family 3A	A1955655	3020	-1,48	-1,08	60. tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,56	1,14
5. ubiquitin specific protease 22	AA621731	23326	-1,32	-1,26	61. myxovirus (influenza) resistance 1, homolog of murine (interferon-inducible protein p78)	NM_002462	4599	-1,36	-1,19
6. paired box gene 8	X89699	7849	-1,38	-1,07	62. transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)	NM_015472	25937	-1,61	1,05
7. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	1,54	2	63. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	NM_003367	7392	-1,34	-1,12
8. protein kinase D2	AL050147	25865	-1,35	-1,17	64. ADP-ribosylation factor-like 7	BG435404	10123	-1,43	-1,6
9. Wiskott-Aldrich syndrome (eczema-thrombocytopenia)	U12707	7454	-1,14	-1,32	65. ADP-ribosylation factor-like 7	BC001051	10123	-1,79	-1,07
10. transport-secretion protein 2.2,	AF055000	57104	-1,33	-1,2	66. phosphoprotein regulated by mitogenic pathways	NM_025195	10221	-1	1,45
11. hypothetical protein FLJ23282	AW001436	AW001436	-1,36	-1,04	67. cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)	NM_000389	1026	1,19	1,35
12. Cluster Incl. AW001777	AW001777		-1,31	-1,12	68. PDGFA associated protein 1	NM_014891	11333	-1,33	1,03
13. leucine-rich repeat protein, neuronal 1	A1654857	4034	-1,32	-1,04	69. casein kinase 1, epsilon	NM_001894	1454	-1,19	1,64
14. hypothetical protein FLJ20258	A1219073	54869	1,32	-1,21	70. peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	NM_000919	5066	1,34	-1,04
15. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	BC003621	3192	1,12	1,45	71. fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,59	-1,02
16. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta, 150/170kD)	BE614908	8661	-1,08	1,31	72. natural killer-tumor recognition sequence	NM_005385	4820	-1,47	1,02
17. actinin, alpha 4	U48734	81	1,31	1,04	73. TGFβ inducible early growth response	NM_005655	7071	1,17	1,97
18. high density lipoprotein binding protein (vigilin)	NM_005336	3069	1,31	1,03	74. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophycin)	NM_001357	1660	1,39	-1,04
19. procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	NM_000918	5034	1,5	1,21	75. protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform (calcineurin A alpha)	NM_000944	5530	-1,47	1,14
20. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,35	1,1	76. v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467	4609	-1,35	-1,13
21. eukaryotic translation elongation factor 1 gamma	NM_001404	1937	-1,34	-1,12	77. discs, large (Drosophila) homolog 1	AW139131	1739	1,46	1,16
22. membrane component, chromosome 11, surface marker 1	NM_005898	4076	1,43	1,05	78. discs, large (Drosophila) homolog 1	BG251175	1739	1,41	1,16
23. ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	AA699583	10097	-1,33	-1	79. thymidylate synthetase	NM_001071	7298	1,24	1,3
24. guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1	A1741124	2782	-1,35	1,12	80. nuclear receptor interacting protein 1	A1824012	8204	-1,97	1,17
25. GNAS complex locus	NM_000516	2778	-1,34	-1,06	81. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	A1738896	7128	1,62	1,35
26. myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	BF594446	4170	-1,1	1,56	82. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	7128	1,64	1,3
27. heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	-1,33	1,08	83. HLA class II region expressed gene KE4	NM_006979	7922	-1,43	-1,05
28. ribosomal protein S10	NM_001014	6204	-1,37	-1,14	84. dolichyl-phosphate mannosyltransferase polypeptide 1, catalytic subunit	NM_003859	8813	1,32	1,12
29. B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	AL535380	694	-1,02	1,32	85. cleavage and polyadenylation specific factor 5, 25 kD subunit	NM_007006	11051	-1,46	-1,02
30. cytoskeleton-associated protein 4	AW029619	10970	-1,42	1,24	86. insulin-like growth factor binding protein 2 (36kD)	NM_000597	3485	-1,72	1,12
31. cytoskeleton-associated protein 4	NM_006825	10970	-1,29	-1,34	87. integral membrane protein 2A	NM_004867	9452	-1,39	1,03
32. tyrosine 3-monoxygenase/tryptophan 5-monoxygenase activation protein, eta polypeptide	NM_003405	7533	1,38	-1,04	88. cyclin G2	NM_004354	901	1,14	1,71
33. dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1843	1,36	1,35	89. KIAA0233 gene product	NM_014745	9780	1,52	1,14
34. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	NM_006805	10949	-1,44	1,11	90. 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylgluta-ricaciduria)	NM_000191	3155	-1,43	-1,09
35. splicing factor 3b, subunit 1, 155kD	A1739389	23451	-1,49	1,12	91. SKIP for skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase	NM_016532	51763	-1,46	-1,09
36. eukaryotic translation initiation factor 5A	BC000751	1984	-1,53	-1,03	92. interleukin 8	NM_000584	3576	1,63	-1,08
37. ATP citrate lyase	NM_001096	47	1,34	1,1	93. 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (40-46 kD)	NM_016816	4938	-1,48	-1,28
38. muscleblind-like (Drosophila)	NM_021038	4154	-1,5	1,03	94. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	D86043	8194	-1,42	-1,04
39. serine/arginine repetitive matrix 1	AU147713	10250	-1,41	-1,19	95. nucleoporin 88kD	NM_002532	4927	-1,4	1,22
40. thioredoxin reductase 1	NM_003330	7296	1,23	1,32	96. four and a half LIM domains 2	NM_001450	2274	1,1	1,48
41. syndecan 1	Z48199	6382	-1,3	-1,05	97. lysophospholipase I	AF077198	10434	-1,37	-1,12
42. cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	NM_001554	3491	1,38	1,55	98. KIAA0429 gene product	NM_014751	9788	-1,28	-1,33
43. prion protein (p27-30) (Creutzfeldt-Jakob disease, Gerstmann-Strausler-Scheinker syndrome, fatal familial insomnia)	NM_000311	5621	1,15	-1,43	99. fibulin 5	NM_006329	10516	-1,86	-1,05
44. SRY (sex determining region Y)-box 4	AL136179		-1,3	-1,18	100. tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,48	1,12
45. claudin 4	NM_001305	1364	-1,05	1,52	101. S100 calcium binding protein A4 (calcium protein, calvasculin, metastasin, murine placental homolog)	NM_002961	6275	-1,42	-1,21
46. aminopeptidase puromycin sensitive	AJ132583	9520	1,34	1,17	102. spinocerebellar ataxia 1 (olivopontocerebellar ataxia 1, autosomal dominant, ataxin 1)	NM_000332	6310	-1,61	-1,13
47. GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 (Sam68)	BC000717	10657	-1,36	-1,06	103. KIAA0863 protein	AK022688	22850	-1,44	-1,23
48. peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	BC005020	10105	1,39	1,18	104. pleckstrin	A1433595	5341	-1,42	-1,11
49. catenin (cadherin-associated protein), beta 1 (88kD)	NM_001904	1499	-1,36	1,15	105. EphA2	NM_004431	1969	1,44	1,25
50. fragile X mental retardation, autosomal homolog 1	A1990766	8087	-1,37	1,22	106. fasciculation and elongation protein zeta 1 (zyglin I)	NM_005103	9638	-1,35	-1,17
51. keratin 19	NM_002276	3880	1,62	1,31	107. RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,72	1,13
52. ariadne homolog, ubiquitin-conjugating enzyme E2 binding protein, 1 (Drosophila)	AL040708	25820	-1,49	-1,04	108. NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 6 (17kD, B17)	NM_002493	4712	1,09	1,32
53. beta-2-microglobulin	NM_004048	567	-1,12	-1,43	109. laminin, alpha 3 (necin (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epiligrin)	NM_000227	3909	1,34	1,11
54. paired basic amino acid cleaving enzyme (furin, membrane associated receptor protein)	NM_002569	5045	-1,39	-1,11	110. epithelial V-like antigen 1	AF275945	10205	1,19	1,33
55. restin (Reed-Steinberg cell-expressed intermediate filament-associated protein)	NM_002956	6249	1,5	-1,24					
56. epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b)	AW157070	1956	-1,37	1,11					
110. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like)	NM_001945	1839	1,36	1,13					

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle J: Zielgene von HGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 129

Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B
111. thrombomodulin	NM_000361	7056	-1,54	1,01	169. karyopherin (importin) beta 2	NM_002270	3842	-1,38	-1,03
112. KIAA0665 gene product	NM_014700	9727	-1,36	-1,46	170. GRO3 oncogene	NM_002090	2921	1,77	1,11
113. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), delta	NM_005195	1052	-1,03	1,48	171. keratin 13	NM_002274	3860	1,7	1,38
114. dual specificity phosphatase 4	BC002671	1846	1,35	1,42	172. Homo sapiens adducin 1 (alpha) (ADD1)	NM_001119		1,03	-1,36
115. nuclear matrix protein p84	NM_005131	9984	-1,18	-1,31	173. liver-specific bHLH-Zip transcription factor	NM_015925	51599	1,68	1,03
116. zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid- responsive)	NM_003422	7593	-1,24	-1,52	174. midline 2	NM_012216	11043	-1,48	-1,43
117. aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	NM_001353	1645	-1,51	-1,04	175. serine/arginine repetitive matrix 2	AI655799	23524	-1,63	1,31
118. MAX binding protein	NM_020310	4335	1,27	1,91	176. filamin B, beta (actin binding protein 278)	M62994	2317	1,31	1
119. phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1	AI857639	5366	1,16	1,57	177. bromodomain-containing 2	AA902767	6046	-1,38	1,04
120. metallothionein 1L	NM_002450	4500	-1,37	-1,02	178. transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,25	1,48
121. Kruppel-like factor 7 (ubiquitous)	AA488672	8609	1,14	1,65	179. cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kD)	BC002711	998	-1,71	-1,07
122. coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001193	2152	1,36	1,27	180. dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	1,1	1,57
123. interferon, alpha-inducible protein (clone IFI-6-16)	NM_022873	2537	-2,32	-1,17	181. dual specificity phosphatase 6	BC003143	1848	1,4	2,04
124. FOS-like antigen-1	BC251266	8061	1,33	1,4	182. dual specificity phosphatase 6	BC005047	1848	1,24	1,63
125. GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	2919	1,34	-1,1	183. ring finger protein 11	AB024703	26994	1,34	-1,14
126. matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	4312	1,13	1,47	184. transforming growth factor, beta receptor II (70-80kD)	D50683	7048	1,39	1
127. protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B (19kD), alpha isoform (calcineurin B, type I)	AL544951	5534	-1,57	-1,16	185. core promoter element binding protein	AB017493	1316	1,05	1,43
128. KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,87	1,07	186. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,64	-1,06
129. dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)	NM_012242	22943	1,36	-1,16	187. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BF248165	10605	-1,4	1,07
130. keratin 15	NM_002275	3866	1,44	1,07	188. ubiquinol-cytochrome c reductase binding protein	M26700	7381	1,23	1,45
131. neuronal protein	NM_013259	29114	2	2,49	189. connective tissue growth factor	M92934	1490	1,8	2
132. prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	5743	1,22	1,99	190. tetraspan 1	AF133425	10103	1,48	1,36
133. Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	1,29	2,01	191. tubulin, alpha 3	AF141347	7846	-1,45	-1,05
134. Ras-related associated with diabetes	NM_004165	6236	1,3	1,88	192. DKFZp564K1671_s1 564 (synonym: hIb2)	AL037401		-1,6	-1,44
135. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-1,78	-1,11	193. insulin receptor substrate 2	AF073310	8660	-1,64	-1,05
136. protein tyrosine phosphatase, receptor type, N	NM_002846	5798	-1,16	2,12	194. mitogen inducible 2	Z24725	10979	1,3	1,43
137. C3H-type zinc finger protein; similar to D. melanogaster muscleblind B protein	AI088145	10150	-1,57	1,1	195. Kruppel-like factor 5 (intestinal)	AB030824	688	-1,53	-1,07
138. a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	1,49	1,19	196. Ewing sarcoma breakpoint region 1	BC004817	2130	1,05	-1,37
139. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	NM_012323	23764	1,2	1,54	197. up-regulated by BCG-CWS	AB040120	64116	1,43	1,18
140. amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	NM_001657	374	1,16	1,5	198. laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	L25541	3914	1,32	1,21
141. eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 3 (gamma, 52kD)	NM_001415	1968	-1,4	-1,12	199. tropomyosin 4	BC002827	7171	1,43	1,11
142. protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	-1,42	-1,4	200. smoothelin	AF064238	6525	1,34	1
143. small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	1,55	2,69	201. alpha-actinin-2-associated LIM protein	AF002280	27295	1,15	2,43
144. transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	NM_001062	6947	-1,38	-1,34	202. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	U19556	6317	-1,34	-1,18
145. bone morphogenetic protein 1	NM_001199	649	1,13	-1,52	203. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,36	-1,38
146. matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	1,63	1,39	204. Microfibril-associated glycoprotein-2	U37283	8076	1,4	1,07
147. epiregulin	NM_001432	2069	1,12	1,4	205. microfibrillar-associated protein 2	AL049569	4237	-1,81	-1,27
148. kallikrein 13	NM_015596	26085	1,53	1,09	206. kallikrein 10	BC002710	5655	1,37	1,03
149. tuftelin 1	NM_020127	7286	1,29	1,58	207. tumor suppressing subtransferable candidate 3	AF001294	7262	1,46	-1,09
150. keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,4	-1,08	208. calmodulin-like 3	M58026	810	-1,49	-1,32
151. lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,34	-1,13	209. uroplakin 1B	NM_006952	7348	1,33	1,1
152. parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	1,41	1,49	210. cathepsin L2	AF070448	1515	1,38	1,23
153. forkhead box D1	NM_004472	2297	1,11	1,52	211. dual-specificity tyrosine-(Y)-phosphorylation regulated kinase 3	AF186773	8444	-1,59	-1,34
154. interferon, gamma-inducible protein 16	NM_005531	3428	-1,4	1,09	212. pinin, desmosome associated protein	AF112222	5411	-1,39	-1,01
155. Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	NM_003412	7545	-1,75	-1,07	213. bridging integrator 1	AF001383	274	-1,55	-1,24
156. lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	-1,43	-1,52	214. heat shock 90kD protein 1, alpha	AF028832	3320	1,37	1,13
157. development and differentiation enhancing factor 2	NM_003887	8853	1,45	-1,27	215. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BC005295	10605	-1,44	-1,07
158. hypothetical protein MGC10771	NM_024506	79411	-1,39	1,05	216. four and a half LIM domains 1	AF098518	2273	-1,38	-1,1
159. keratin, hair, acidic, 1	NM_002277	3881	1,54	1,01	217. parathyroid hormone-like hormone	J03580	5744	1,37	1,5
160. bone morphogenetic protein 1	NM_006128	649	-1,14	-1,63	218. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,53	-1,18
161. Ste20-related serine/threonine kinase	NM_014720	9748	1,39	1,09	219. interleukin 1 receptor-like 1	AB012701	9173	-1,06	2,96
162. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,45	-1,32	220. actin binding LIM protein 1	BC002448	3983	-1,35	1,03
163. variable charge protein on X with two repeats	NM_016378	51480	-1,59	-1,07	221. inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	1,64	2,19
164. staufer, RNA binding protein (Drosophila)	NM_004602	6780	1,32	1,11	222. A kinase (PRKA) anchor protein (gravin) 12	AB003476	9590	2	1,65
165. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,28	1,54	223. RNA helicase-related protein	AF078844	11325	-1,34	-1,81
166. protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,4	-1,09	224. chromosome 14 open reading frame 143	BC001787		-1,42	1,07
167. laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa))	NM_018891	3918	1,43	1,52	225. LIM domain kinase 2	AL117466	3985	-1,33	-1,08
168. zinc finger protein 261	NM_005096	9203	-1,05	-1,59	226. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,12	1,4
					227. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,05	-2,23
					228. inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	-1,11	-1,91
					229. cysteine-rich, angiogenic inducer, 61	AF003114	3491	-1,07	1,4
					230. plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	1,92	1,85
					231. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		1,32	1,15

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle J: Zielgene von HGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 130

Gen	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B
232. interleukin 13 receptor, alpha 1	U81380	3597	-2,18	1,28	287. Human DNA sequence from clone RP1-30P20 on chromosome Xq21.1-21.3 Contains a SET translocation (myeloid leukemia-associated) (SET)				
233. programmed cell death 10	BC002506	11235	-1,09	1,31	pseudogene	Z95126		-1,42	1,13
234. prefoldin 5	AB055804	5204	-1,36	1,04	poly(A) binding protein, cytoplasmic, pseudogene 3	U64661	26978	-1,38	1,05
235. WD repeat domain 1	AF274954		-1,59	1,03	chromosome 11 open reading frame 9	AC004770	745	-1,54	1,06
236. tropomyosin 1 (alpha)	ZZ4727	7168	1,39	1,07	protein phosphatase 2A, regulatory subunit B' (PR 53)	X86428	5524	-1,31	-1,34
237. cytochrome c oxidase subunit Vb	BC006229	1329	-1,4	-1,02	Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		1,12	1,42
238. folate receptor 1 (adult)	AF000381		-2,29	-1,23	IBR domain containing 3	AL031602		-1,34	-1,32
239. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	AF115544	1029	-1,45	1,07	protocadherin gamma subfamily A, 3	AF152509	56112	-2,16	-1,04
240. actinin, alpha 1	M95178	87	1,32	1,17	CGI-53 protein	AL121886	51098	-1,52	1,14
241. interleukin 8	AF043337	3576	1,59	-1,18	Human DNA sequence from clone RP5-107L10 on chromosome 20				
242. cyclin G2	L49506	901	1,32	1,3	Contains part of the TMSB4L gene for thymosin beta 4-like and the 3' end of the BCAS4 gene for breast carcinoma amplified sequence 4	AL133228		1,33	-1,01
243. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,47	-1,47	Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	M14087		-1,36	1,04
244. glutathione synthetase	L42531	2937	-1,3	-1,01	aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	S68290	1645	-1,58	-1,11
245. aldo-keto reductase family 1, member C2 (dihydrodiol dehydrogenase 2; bile acid binding protein; 3-alpha hydroxysteroid dehydrogenase, type III)	M33376		-1,4	-1,03	proline-rich protein BstNI subfamily 4	X07882		-1,2	-1,34
246. plasminogen activator, urokinase	K03226	5328	1,35	1,2	neubulette	AL157398		-1,37	1,05
247. Homo sapiens PNAS-20	AF274945		-1,77	1,08	metallothionein 1F (functional)	M10943	4494	-1,4	-1,28
248. CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	AF349444	23741	1,78	1,14	butyrophilin-like 3	AK025267	10917	-1,36	1,06
249. parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1,53	1,32	pM5 protein	AL12687	23420	1,09	-1,31
250. plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	1,62	2,1	Homo sapiens aconitase precursor (ACON)	AF086790		-1,43	-1,21
251. myosin, heavy polypeptide 9, non-muscle	A1827941	4627	1,55	-1,05	leucine rich repeat containing 16	AL024509		-1,36	-1,12
252. zinc finger protein 36, C3H type-like 1	BG250310	677	1,32	1,48	fusion, derived from t(12;16) malignant liposarcoma	S75762	2521	-1,41	-1,08
253. Homo sapiens cDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122	AK026168		-1,11	-1,66	collagen, type I, alpha 1	Y15916	1277	-1,39	-1,17
254. ras homolog gene family, member B	AI263909	388	1,16	1,72	HUMBT Chromosome 16p13.3 Exon Homo sapiens genomic clone h-80	L48784		-1,36	1,01
255. RNA binding motif protein 9	N95026	23543	-1,4	1,01	phosphatase and tensin homolog (mutated in multiple advanced cancers 1), pseudogene 1	AF023139	11191	-1,66	-1,08
256. dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,49	-1,04	small EDRK-rich factor 2	NM_005770	10169	-1,46	-1,14
257. v-crk sarcoma virus CT10 oncogene homolog (avian)-like	AK000311		1,41	-1,13	cell division cycle 27	NM_001256	996	-1,68	-1,25
258. 602381262F1 NIH_MGC_93 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4499078 5'	BG289001		-1,51	-1,03	hypothetical protein FLJ10350	NM_018067	55700	1,31	1,1
259. fibronectin 1	X02761	2335	1,31	-1,02	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	AA576961	22822	1,16	1,48
260. Homo sapiens clone FBD3 Cri-du-chat critical region	AF056433		-1,34	-1,04	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	A1795908	22822	1,35	1,25
261. CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	AL564683	1051	1,09	1,4	pleckstrin homology-like domain, family A, member 1	NM_007350	22822	-1,04	1,46
262. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 3	R60068	1654	-1,36	1,01	small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK)	NM_004887	9547	-1,72	-1,28
263. 602565589F1 NIH_MGC_77 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:4690079 5'	BG537190		1,38	1,06	40S ribosomal protein S27 isoform	NM_015920	51065	1,36	1,28
264. C-terminal binding protein 1	BF337195	1487	-1,35	-1,12	likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60695	-1,58	1,62
265. SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AJ131244	10802	-1,33	-1,06	chromosome 11 open reading frame 15	NM_020644	56674	-1,13	-1,35
266. SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	BE645231	10802	2,16	-1,22	FXD domain-containing ion transport regulator 5	NM_014164	53827	1,35	1,14
267. w39d10.x1 NCI_CGAP_Pr28 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2490067 3'	AI972416		-1,4	-1,23	adaptor-related protein complex 1, mu 2 subunit	NM_005498	10053	-1,33	-1,18
268. tousled-like kinase 2	AU151689	11011	-1,39	-1,16	A20-binding inhibitor of NF-kappaB activation-2	NM_024309	79155	-1,05	-1,38
269. myristoylated alanine-rich protein kinase C substrate	AA770596	4082	-1,52	-1,15	trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,54	-1,23
270. karyopherin (importin) beta 1	BG249565	3837	1,38	1,04	pseudouridylyl synthase 1	NM_025215	80324	-2,7	1,59
271. tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	AA502643	7531	-1,22	-1,47	type I transmembrane receptor (seizure-related protein)	NM_012410	26470	-1,2	-1,64
272. myosin IF	BF740152	4542	-2,98	1,95	malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,2	-2,03
273. eukaryotic translation initiation factor 5A	BF541557	1994	-1,65	-1,09	glycolipid transfer protein	NM_016433	51228	-1,4	1,31
274. N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)	AI379338	427	-1,41	-1,21	hypothetical protein FLJ10134	NM_018004	55076	-1,33	-1,02
275. interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA749101	8519	-1,11	-1,3	RAB38, member RAS oncogene family	NM_022337	23682	1,06	-1,32
276. ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	-1,47	-1,31	hypothetical protein FLJ21870	NM_023016	65124	1,27	1,4
277. splicing factor 3b, subunit 1, 155kD	AW003030	23451	-1,47	1,09	claudin 15	NM_014343	24146	-1,58	1,02
278. trefol factor 2 (spasmolytic protein 1)	NM_005423	7032	-1,54	-1,15	hypothetical protein FLJ20186	NM_017702	54849	1,16	-1,33
279. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	AY007087	7392	-1,39	-1,15	erythroid differentiation-related factor	NM_016633	51327	-1,46	1,04
280. bromodomain-containing 2	S78771	6046	-1,46	1,05	retinol dehydrogenase homolog	NM_005771	10170	-1,36	-1,1
281. amyloid beta (A4) precursor protein (protease nexin-II, Alzheimer disease)	X06989	351	-1,84	-1,09	hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,34	1,05
282. phosphoinositid 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,49	1,28	hypothetical protein FLJ13841	NM_024702	79755	-1,3	-1,72
283. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)	BG166705	6374	1,73	1,02	mucin 16	NM_024690	94025	-1,39	-4,14
284. peroxisome receptor 1	AW468717	5830	-1,88	-1,62	F-box protein 17	NM_024907	79967	-2,02	1,48
285. tr75d05.x1 NCI_CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2224137 3' similar to contains Alu repetitive element	AI590053		1,07	1,3	hypothetical protein FLJ11710	NM_024846	79904	-1,39	-1,11
286. chromosome condensation 1	X06130	1104	-1,4	-1,01	hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	-3,04	2,2
340. NICE-1 protein	NM_019060	54544	1,4	-1					
341. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,43	-1,1	hypothetical protein My014	NM_030918	81609	-1,76	-1,21
					UL16 binding protein 2	NM_025217	80328	1,3	-1,07

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinozyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinozyten (HGF), ^{KGF}Keratinozyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinozyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten als Referenzwerte.


Fortsetzung von Tabelle J: Zielgene von HGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Gen		'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	Gen		'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B
344.	Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-2,04	-1,73	350.	guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3	AI719730	2982	-1,77	1,42
345.	hypothetical protein FLJ20258	BC004907	54869	1,64	1,08	351.	leucine-rich repeat protein, neuronal 1	AI631881	4034	2,02	-1,38
346.	3-hydroxy-3-methylglutaryl-Coenzyme A synthase 1 (soluble)	BG035985	3157	1,46	-1,15	352.	hypothetical protein	AK023069	51531	-1,31	-1,03
347.	AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		-1,12	1,46	353.	ACO for serine protease homologue	AF243527	55554	-1,44	-1,41
348.	serologically defined breast cancer antigen NY-BR-20	AA886335	91860	1,35	1,31						
349.	y31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-1,16	-1,48						


Tabelle K: Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Gen		'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B	Gen		'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
1.	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	NM_016587	11335	1,09	-1,41	35.	chaperonin containing TCP1, subunit 3 (gamma)	NM_005998	7203	1,25	-1,35
2.	hypothetical protein	U69190	54555	-1,01	1,37	36.	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	AL535380	694	-1,02	1,86
3.	KIAA0615 gene product	AB014515	9683	1,2	1,5	37.	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	NM_001731	694	-1,09	1,63
4.	v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	1,13	2,12	38.	RAB14, member RAS oncogene family	AA919115	51552	1,33	-1,08
5.	peroxisome proliferative activated receptor, delta	L07592	5467	-1,14	1,4	39.	DEK oncogene (DNA binding)	NM_003472	7913	1,29	-1,37
6.	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	M60278	1839	-1,04	1,52	40.	syndecan binding protein (syntenin)	NM_005625	6386	1,13	1,48
7.	protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	L10343	5266	-1,07	1,34	41.	palmitoyl-protein thioesterase 1 (ceroid-lipofuscinosis, neuronal 1, infantile)	NM_000310	5538	1,16	-1,53
8.	peroxisomal biogenesis factor 16	AA523441	9409	-1,37	-1,02	42.	cytoskeleton-associated protein 4	AW029619	10970	-1,44	1,01
9.	Cluster Incl. AA150503	AA150503		-1,66	-1,06	43.	cytoskeleton-associated protein 4	NM_006825	10970	-1,33	-1,2
10.	hypothetical protein FLJ20116	AA469071	55612	-1,08	1,48	44.	thioredoxin interacting protein	AA812232	10628	1,23	2,04
11.	hypothetical protein FLJ20258	AI219073	54869	1,18	1,36	45.	thioredoxin interacting protein	AI439556	10628	1,29	1,87
12.	nucleolin	NM_005381	4691	1,17	-1,37	46.	thioredoxin interacting protein	NM_006472	10628	1,36	2,03
13.	high density lipoprotein binding protein (vigliin)	NM_005336	3069	1,33	1,18	47.	multifunctional polypeptide similar to SAICAR synthetase and AIR carboxylase	AA902652	10606	1,14	-1,7
14.	glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	NM_002065	2752	1,05	2,32	48.	multifunctional polypeptide similar to SAICAR synthetase and AIR carboxylase	NM_006452	10606	-1,1	-1,38
15.	procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	NM_000918	5034	1,18	1,3	49.	dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1843	-1,21	1,35
16.	translocase of outer mitochondrial membrane 20 (yeast) homolog	NM_014765	9804	1,22	-1,37	50.	karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	NM_002266	3838	1,05	-1,59
17.	ubiquitin-conjugating enzyme E2D 3 (UBC4/5 homolog, yeast)	NM_003340	7323	-1,02	1,31	51.	chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	BE748755	11335	1,24	-1,3
18.	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,32	1,36	52.	thrombospondin 1	AI812030	7057	1,31	-1,66
19.	LPS-induced TNF-alpha factor	AB034747	9516	-1,01	1,34	53.	thrombospondin 1	BF055462	7057	1,08	-1,69
20.	FK506 binding protein 1A (12kD)	NM_000801	2280	1,31	1,06	54.	ATP citrate lyase	NM_001096	47	1,14	-1,34
21.	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	NM_005722	10097	1,24	1,48	55.	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	L08599	999	1,11	1,31
22.	phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	5230	-1,11	1,35	56.	eukaryotic translation initiation factor 2, subunit 1 (alpha, 35kD)	NM_004094	1965	-1,08	-1,4
23.	phosphoglycerate kinase 1	NM_000291	5230	1,38	1,38	57.	chromodomain helicase DNA binding protein 4	NM_001273	1108	-1,35	1,02
24.	ferritin, heavy polypeptide 1	NM_002032	2495	1,03	1,37	58.	isocitrate dehydrogenase 1 (NADP+), soluble	NM_005896	3417	1,09	-1,39
25.	RAN, member RAS oncogene family	BF112006	5901	1,15	-1,59	59.	proliferating cell nuclear antigen	NM_002592	5111	1,25	-1,76
26.	activating transcription factor 4 (tax-responsive enhancer element B67)	NM_001675	468	-1,05	2,09	60.	enolase 1, (alpha)	NM_001428	2023	1,36	-1,04
27.	ornithine decarboxylase 1	NM_002539	4953	-1,02	-1,34	61.	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	BC000006	481	-1,04	3,5
28.	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	BF594446	4170	1,09	1,52	62.	ATPase, Na+/K+ transporting, beta 1 polypeptide	NM_001677	481	-1,03	3,1
29.	myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	AI275690	4170	-1	1,54	63.	solute carrier family 2 (facilitated glucose transporter), member 1	NM_006516	6513	1,03	1,61
30.	heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	1,51	1,04	64.	pyruvate kinase, muscle	NM_002654	5315	1,33	1,07
31.	heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	1,41	1,05	65.	thioredoxin reductase 1	NM_003330	7296	1,13	1,33
32.	stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	AB032261	6319	1,03	-1,33	66.	aldo-keto reductase family 1, member B1 (aldose reductase)	NM_001628	231	-1,18	1,6
33.	24-dehydrocholesterol reductase	NM_014762	1718	-1,07	-1,48	67.	acidic protein rich in leucines	NM_006401	10541	1,15	-1,35
34.	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)	NM_003144	6745	1,38	-1,24	68.	epithelial membrane protein 1	NM_001423	2012	1,16	1,32
69.	general transcription factor IIA	NM_002097	2971	-1,04	-1,39	72.	claudin 4	NM_001305	1364	-1,2	1,62
70.	glutathione peroxidase 3 (plasma)	NM_002084	2878	-1,28	-1,75	73.	aminopeptidase puromycin sensitive	AW055008	9520	1,11	1,48
71.	heat shock protein 75	NM_016292	10131	1,06	-1,33	74.	aminopeptidase puromycin sensitive	AJ132583	9520	1,19	1,45

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle K: Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 132

Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
75. NAD(P)H dehydrogenase, quinone 1	NM_000903	1728	1,11	-1,49	130. discs, large (Drosophila) homolog 1	BG251175	1739	1,6	1,24
76. sequestosome 1	NM_003900	8878	1,14	1,63	131. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	A1738896	7128	1,32	1,86
77. dyskeratosis congenita 1, dyskerin	NM_0011363	1736	1,18	-1,96	132. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	7128	1,13	1,55
78. GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 (Sam68)	BC000717	10657	-1,3	-1,06	133. RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	NM_002890	5921	1,3	-1,04
79. peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	BC005020	10105	1,14	1,37	134. interferon gamma receptor 1	NM_000416	3459	1,02	1,48
80. peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	NM_005729	10105	1,14	1,37	135. procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), alpha polypeptide II	NM_004199	8974	1	1,5
81. nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha	A1078167	4792	-1,16	1,74	136. cyclin G2	AW134535	901	-1,06	1,79
82. Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	BG500067	10146	1,33	-1,22	137. cyclin G2	NM_004354	901	-1,02	1,82
83. chloride intracellular channel 4	NM_013943	25932	1,23	1,32	138. acidic 82 kDa protein mRNA	NM_014597	30836	1,1	-1,36
84. golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	NM_002078	2803	1,44	-1,03	139. claudin 7	NM_001307	1366	1,02	1,37
85. RuvB-like 1 (E. coli)	NM_003707	8607	-1,02	-1,71	140. serine protease inhibitor, Kunitz type 1	NM_003710	6692	1	1,39
86. immediate early response 3	NM_003897	8870	1,02	1,47	141. glutathione peroxidase 2 (gastrintestinal)	NM_002083	2877	1,05	-1,59
87. Janus kinase 1 (a protein tyrosine kinase)	AL039831	3716	1,1	1,4	142. interleukin 8	NM_000584	3576	1,45	1,81
88. keratin 19	NM_002276	3880	1,44	1,57	143. CDC20 cell division cycle 20 homolog (S. cerevisiae)	NM_001255	991	1,33	-1,57
89. cornichon-like	NM_005776	10175	1,35	-1,32	144. HIF-1 responsive RTP801	NM_019058	54541	1,02	1,97
90. ribosomal protein S17	NM_001021	6218	-1,31	-1,25	145. adrenomedullin	NM_001124	133	-1,06	1,5
91. gap junction protein, alpha 1, 43kD (connexin 43)	NM_000165	2697	1,16	-1,33	146. hexokinase 2	A1761561	3099	1,12	3
92. DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	NM_0011379	1786	1,21	-1,65	147. zinc metalloproteinase (STE24 homolog, yeast)	NM_005857	10269	1,36	-1,16
93. D123 gene product	NM_006023	8872	-1	-1,33	148. T-cell leukemia translocation altered gene	NM_022171	6988	1,21	1,47
94. neuroepithelial cell transforming gene 1	AV263232	10276	-1,02	1,32	149. dynamin 1-like	NM_012062	10059	1,32	-1,08
95. protein kinase, AMP-activated, beta 1 non-catalytic subunit	NM_006253	5564	2,18	1,21	150. retinoic acid induced 3	NM_003979	9052	1,25	1,87
96. EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	A1826799	2202	1,13	-1,52	151. Wilms' tumour 1-associating protein	NM_004906	9589	1,42	1,09
97. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3	U15174	664	1,1	2,49	152. tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,32	-1,08
98. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3	NM_004052	664	1,05	3,22	153. cell division cycle 2, G1 to S and G2 to M	AL524035	983	1,02	-1,68
99. plasminogen activator, tissue	NM_000930	5327	-1,48	2,55	154. glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1 (glycogen branching enzyme, Andersen disease, glycogen storage disease type IV)	NM_000158	2632	1,22	1,62
100. ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	A1002002	6059	1,2	-1,47	155. ladinin 1	NM_005558	3898	-1,06	-1,47
101. ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	NM_002940	6059	1,03	-1,82	156. MKP-1 like protein tyrosine phosphatase	NM_007026	11072	1,14	1,33
102. ribonucleotide reductase M2 polypeptide	BE966236	6241	1,1	-1,96	157. splicing factor, arginine/serine-rich 5	NM_006925	6430	1,03	1,38
103. IMP (inosine monophosphate) dehydrogenase 2	NM_000884	3615	1,04	-1,3	158. Down syndrome critical region gene 2	NM_003720	8624	1,19	-1,61
104. solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	NM_005415	6574	1,05	-1,67	159. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	NM_002970	6303	1,06	2,06
105. myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia (trithorax homolog, Drosophila); translocated to, 2	NM_005935	4299	1,05	1,94	160. trophoblast glycoprotein	NM_006670	7162	1,13	1,62
106. decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	NM_000574	1604	-1,13	1,74	161. EphA2	NM_004431	1969	1,05	1,43
107. decay accelerating factor for complement (CD55, Cromer blood group system)	BC001288	1604	1,08	1,58	162. RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,54	1,12
108. chaperonin containing TCP1, subunit 2 (beta)	NM_006431	10576	1,19	-1,39	163. protease inhibitor 3, skin-derived (SKALP)	NM_002638	5266	-1,1	1,38
109. putative translation initiation factor	AF083441	10209	-1,07	1,42	164. laminin, alpha 3 (nicein (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epilegrin)	NM_000227	3909	1,23	1,4
110. ribosomal protein L38	BC000603	6169	1,4	1,46	165. carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	BC005008	4680	1,08	1,93
111. secreted frizzled-related protein 1	NM_003012	6422	1,03	-2,08	166. sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	NM_006379	10512	1,14	1,37
112. syndecan 4 (amphiglycan, ryudocan)	NM_002999	6385	-1,15	1,35	167. visinin-like 1	AF039555	7447	-1,07	-1,54
113. tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains; Huntingtin interacting protein L; transcription factor IIIA-interacting protein	NM_021980	10133	-1,2	1,35	168. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1,09	1,54
114. baculoviral IAP repeat-containing 2	NM_001166	329	1,6	1,33	169. natural killer cell transcript 4	NM_004221	9235	1,26	1,84
115. tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,23	1,37	170. small nuclear ribonucleoprotein polypeptide F	NM_003095	6636	-1,01	-1,31
116. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AA725102	23764	1,02	1,34	171. thrombomodulin	NM_000361	7056	-1,44	-1,13
117. JTV1 gene	NM_006303	7965	1,11	-1,42	172. glutamate-cysteine ligase, modifier subunit	NM_002061	2730	-1,03	-1,66
118. polypyrimidine tract binding protein (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I)	NM_002819	5725	-1,05	-1,33	173. matrix metalloproteinase 9 (gelatinase B, 92kD gelatinase, 92kD type IV collagenase)	NM_004994	4318	-1,17	1,64
119. laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa)	NM_005562	3918	1,07	1,52	174. carbonic anhydrase XII	NM_001218	771	-1,21	1,66
120. casein kinase 1, epsilon	NM_001894	1454	-1,29	1,5	175. translin-associated factor X	NM_005999	7257	1,17	2,23
121. ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homolog)	AA877765	7320	1,08	1,53	176. mitochondrial ribosomal protein S12	NM_021107	6183	-1,01	-1,54
122. fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,34	-1,22	177. S100 calcium binding protein P	NM_005980	6286	-1,33	1,7
123. integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)	A1093579	3685	1,17	1,37	178. mitochondrial ribosomal protein 63	BF303597	78988	-1,01	-1,32
124. TGFβ inducible early growth response	NM_005655	7071	1,15	1,8	179. mitochondrial ribosomal protein 63	NM_024026	78988	1,59	1,16
125. ubiquitin specific protease 1	NM_003368	7398	1,29	-1,77	180. monoamine oxidase A	NM_000240	4128	-1,13	1,39
126. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophysin)	NM_001357	1660	1,47	-1,19	181. putative dimethyladenosine transferase	NM_014473	27292	1,12	-1,49
127. v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467	4609	-1,07	-1,62	182. GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	2919	1,17	1,49
128. RAN binding protein 1	NM_002882	5902	-1,05	-1,39	183. matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	4312	-1,16	1,75
129. KIAA0101 gene product	NM_014736	9768	1,18	-1,43	184. U6 snRNA-associated Sm-like protein LSM7	NM_016199	51690	-1,29	-1,36
					185. KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,45	1,24
					186. KIAA0615 gene product	NM_014664	9683	1,06	1,48
					187. potassium channel, subfamily K, member 1 (TWIK-1)	NM_002245	3775	1,03	1,47

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinozyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinozyten (HGF), ^{KGF}Keratinozyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinozyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle K: Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 133

Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
188. prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	5743	-1,03	1,34	247. protein)	BC000914	6428	-1,11	-1,44
189. desmocollin 2	BF196457	1824	1,47	1,22	248. basigin (OK blood group)	AL550657	682	1,63	1,3
190. KIAA0938 protein	NM_014903	22840	-1,05	1,54	249. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 9 (eta, 116kD)	U78525	8662	1,06	-1,32
191. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-1,89	-1,05	250. transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,34	-1,03
192. follistatin	NM_013409	10468	-1,08	-1,58	251. glycyL-tRNA synthetase	D30658	2617	-1,07	1,35
193. heparin-binding growth factor binding protein	NM_005130	9982	-1,04	-1,38	252. potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 4	Z97056	3761	-1,02	1,32
194. integrin, alpha 2 (CD49B, alpha 2 subunit of VLA-2 receptor)	NM_002203	3673	-1,15	1,51	253. 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide formyltransferase/IMP cyclohydrolase	D89976	471	1,16	-1,48
195. vaccinia related kinase 2	NM_006296	7444	-1,16	1,33	254. membrane cofactor protein (CD46, trophoblast-lymphocyte cross-reactive antigen)	AL570661	4179	1,36	-1,09
196. heat shock 10kD protein 1 (chaperonin 10)	NM_002157	3336	1,02	-1,37	255. microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3	AF183417	81631	1,14	1,76
197. a disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	1,3	1,37	256. mitochondrial ribosomal protein L3	BC003375	11222	1,19	-1,55
198. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	NM_012323	23764	1,15	1,64	257. signal recognition particle 72kD	BE856385	6731	1,05	-1,33
199. guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha 15 (Gq class)	NM_002068	2769	-1,08	1,45	258. calnexin	L18887	821	1,31	1,01
200. dihydrolipoamide branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)	NM_001918	1629	1,43	1,18	259. complement component 1, q subcomponent binding protein	L04636	708	1,26	-1,34
201. inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kD	NM_003866	8821	1,08	1,71	260. chromosome 3 open reading frame 4	AF161522	56650	1,37	1,54
202. interleukin 1 receptor, type II	NM_004633	7850	1,21	2,02	261. dUTP pyrophosphatase	U62891	1854	1,05	-1,39
203. H2A histone family, member X	NM_002105	3014	1,01	-1,64	262. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,59	-1,24
204. small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	-1,05	6,3	263. similar to MRJ gene for a member of the DNAJ protein family (H. sapiens)	BC002446	136442	1,04	1,81
205. plasminogen activator, urokinase	NM_002658	5328	1,05	1,5	264. NS1-associated protein 1	AI472757	10492	1,39	-1,29
206. transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	NM_001062	6947	-1,4	-1,17	265. NS1-associated protein 1	AF037448	10492	1,16	-1,56
207. 2',5'-oligoadenylate synthetase 1 (40-46 kD)	NM_002534	4938	-1,05	1,42	266. proline-rich protein with nuclear targeting signal	AF279899	10957	-1,05	1,82
208. bone morphogenetic protein 1	NM_001199	649	-1,53	1,13	267. H3 histone, family 3B (H3.3B)	BC001124	3021	-1,55	1,08
209. E3 ubiquitin ligase SMURF2	AY014180	64750	1,08	1,3	268. interferon-related developmental regulator 2	BC001327	7866	1,01	-1,57
210. aminolevulinate, delta-, synthase 1	NM_000688	211	1,07	1,58	269. 5'-nucleotidase (purine), cytosolic type B	BC001595	22978	1,17	1,47
211. matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	1,15	2,24	270. C2f protein	U72514	10436	1,02	-1,48
212. tuftelin 1	NM_020127	7286	1,07	1,44	271. up-regulated by BCG-CWS	AB040120	64116	1,42	-1,19
213. S100 calcium binding protein A12 (calgranulin C)	NM_005621	6283	-1,47	3,6	272. laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	L25541	3914	1,13	1,48
214. nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NM_004741	9221	1,49	-1,53	273. UDP-N-acetylglucosamine pyrophosphorylase 1	S73498	6675	1,04	1,39
215. keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,35	-1,14	274. smoothelin	AF064238	6525	-1,01	1,3
216. S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1)	NM_002963	6278	-1,2	2,15	275. HIV-1 Tat interactive protein 2, 30 kDa	BC002439	10553	-1,07	-1,45
217. H4 histone family, member B	NM_003542	8364	-1,12	-1,76	276. thioredoxin domain-containing	AL080080	81542	1,13	-1,38
218. neuromedin U	NM_006681	10874	1,3	-1,81	277. alpha-actinin-2-associated LIM protein	AF002280	27295	3,43	1,31
219. lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,45	-1,02	278. carboxylesterase 2 (intestine, liver)	BF033242	8824	1,03	-1,45
220. parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	1,23	-1,6	279. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	U19556	6317	-1,28	1,43
221. lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	-1,47	-1,57	280. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,37	1,41
222. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 7	NM_003784	8710	1,16	1,4	281. ribonucleotide reductase M2 polypeptide	BC001886	6241	1,18	-1,53
223. hypothetical protein FLJ20059	NM_017644	54800	1,3	1,21	282. methionyl aminopeptidase 2	U13261	10988	-1,04	-1,33
224. G protein-coupled receptor 56	NM_005682	9289	-1,56	1,22	283. dUTP pyrophosphatase	U90223	1854	1,07	-1,42
225. bone morphogenetic protein 1	NM_006128	649	-1,63	1,01	284. neutrophil cytosolic factor 2 (65kD, chronic granulomatous disease, autosomal 2)	BC001606	4688	1,29	2,29
226. similar to yeast Utp3, variant A	AF318575	65110	1,18	2,86	285. JTV1 gene	AI928526	7965	1,01	-1,61
227. heat shock 105kD	NM_006644	10808	1,16	-1,43	286. T-cell leukemia/lymphoma 1A	BC003574	8115	2,55	1,11
228. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,28	-1,69	287. JAK binding protein	AB005043	8651	-1,32	1,92
229. discoidin domain receptor family, member 1	NM_001954	780	1,05	1,38	288. calmodulin-like 3	M58026	810	-1,52	-1,66
230. Nef-associated factor 1	NM_006058	10318	1,17	1,96	289. APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme)	M80261	328	1,09	-1,37
231. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,3	1,05	290. mitogen-activated protein kinase 13	BC000433	5603	-1,88	-1,26
232. defensin, beta 2	NM_004942	1673	-1,27	9,76	291. PAI-1 mRNA-binding protein	AF151813	26135	1,17	-1,35
233. protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,36	-1,11	292. insulin-like growth factor binding protein 3	M31159	3486	1,24	3,03
234. laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitiz junctional epidermolysis bullosa)	NM_018891	3918	1,16	1,51	293. interleukin 1, alpha	M15329	3552	1,25	1,71
235. plakophilin 2	NM_004572	5318	1,04	1,51	294. regulator of G-protein signalling 20	AF074979	8601	1,08	-1,49
236. nuclear receptor co-repressor 2	NM_006312	9612	1,17	1,53	295. nuclear receptor coactivator 1	U59302	8648	-1,04	2,15
237. adenosine monophosphate deaminase (isoform E)	NM_000480	272	-1,17	1,58	296. tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	U28936	7531	1,55	1,04
238. peroxisome proliferative activated receptor, delta	NM_006238	5467	-1,06	1,42	297. defensin, beta 1	U73945	1672	-1,47	-1,23
239. sema domain, immunoglobulin domain (Ig), transmembrane domain (TM) and short cytoplasmic domain, (semaphorin) 4F	NM_004263	10505	1,02	1,96	298. RAB6C, member RAS oncogene family	AL136727	84084	1,21	1,38
240. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 21	NM_004728	9188	1,19	-1,58	299. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,35	1,58
241. hypothetical protein FLJ20006	NM_017618	54782	1,44	1,56	300. inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	-1,14	1,9
242. splicing factor 1	NM_004630	7536	-1,79	-1,18	301. vascular endothelial growth factor	AF022375	7422	-1,08	1,45
243. interferon regulatory factor 7	NM_004030	3665	-1,12	1,44	302. HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	AF226990	3135	-1,02	1,44
244. small proline-rich protein 2B	NM_006945	6701	1,13	2,04	303. CASP8 and FADD-like apoptosis regulator	U97075	8837	-1,32	1,11
245. CD24 antigen (small cell lung carcinoma cluster 4 antigen)	BG327863	934	1,15	1,33	304. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	1,02	1,97
246. suppression of tumorigenicity 13 (colon carcinoma) (Hsp70 interacting	U17714	6767	-1,6	-1,04					

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle K: Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 134

Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank accession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
305. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	M19156	3858	-1,28	-1,58	363. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	X14487	3858	-1,26	-1,49
306. dystrobrein, alpha	U46746	1837	-1,6	-1,17	364. RAR (RAS like GTPASE)	BE965869	57799	1,01	-2,33
307. inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	7,07	-2,26	365. coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1	BE965369	2150	1,31	-1,44
308. IQ motif containing GTPase activating protein 1	D29640	8826	1,26	1,31	366. carboxylesterase 2 (intestine, liver)	AW157619	8824	-1,15	-1,39
309. plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	-1,05	1,63	367. lactate dehydrogenase B	BE042354	3945	-1,12	-1,31
310. melanoma cell adhesion molecule	M29277	4162	2,46	1,72	368. HSPC022 protein	BE138888	28963	-1,12	1,36
311. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		-1,13	2,22	369. mucin 1, transmembrane	A1610869	4582	1,07	1,77
312. jumping translocation breakpoint	BC004239	10899	-1,1	-1,32	370. RAP2B, member of RAS oncogene family	AW005535	5912	-1,31	1,23
313. tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, epsilon polypeptide	U43430	7531	1,38	-1,03	371. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	BE971383	6303	-1,07	1,9
314. folate receptor 1 (adult)	AF000381		1,92	-1,25	372. myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	AA419227	4637	1,43	1,1
315. CD47 antigen (Rh-related antigen, integrin-associated signal transducer)	Z25521	961	1,02	1,35	373. hypothetical protein	BE314601	51491	1,13	-1,41
316. annexin A2 pseudogene 3	M62895	305	1,41	1,01	374. interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA749101	8519	-1,46	-1,05
317. interleukin 1 receptor, type II	U64094	7850	1,27	2,13	375. putative integral membrane transporter	T15777	55353	-1,07	-1,37
318. interleukin 8	AF043337	3576	1,26	2,11	376. splicing factor, arginine/serine-rich 7 (35kD)	BF033354	6432	-1,04	-1,73
319. HLA-G histocompatibility antigen, class I, G	M90684	3135	-1,03	1,41	377. adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	BF752277	164	-1,13	1,39
320. cyclin G2	L49506	901	-1,05	1,77	378. hematopoietic PBX-interacting protein	A1935162	57326	1,03	1,43
321. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,43	-1,09	379. ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	-1,09	-1,49
322. protein tyrosine phosphatase, receptor type, O	U20489	5800	1,44	-1,14	380. complement component 1, q subcomponent binding protein	AU151801	708	1,27	-1,53
323. casein kinase 2, beta polypeptide	M30448	1460	-1,05	-1,6	381. H2A histone family, member O	A1313324	8337	1,02	1,32
324. carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6 (non-specific cross reacting antigen)	M18728	4680	1,1	1,75	382. heat shock 90kD protein 1, alpha	R01140	3320	1,38	-1,07
325. plasminogen activator, urokinase	K03226	5328	1,12	1,52	383. retinoic acid receptor, alpha	T91506	5914	-1,14	1,56
326. Homo sapiens PNAS-20	AF274945		2,54	7,51	384. heat shock 90kD protein 1, beta	A1218219	3326	1,12	-1,37
327. enolase 1, (alpha)	BC005884	2023	1,11	1,44	385. acetyl-Coenzyme A carboxylase beta	R99037	32	6,87	-1,22
328. U6 snRNA-associated Sm-like protein	BC005938	23658	1,09	-1,54	386. aldolase A, fructose-bisphosphate	AK026577	226	1,1	1,31
329. parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1,17	-1,7	387. hypothetical protein MGC14376	AF070569	84981	1,06	1,47
330. Slah-interacting protein	BC005975	27101	1,05	-1,81	388. KRAB zinc finger protein KR18	AK024789	90338	1,45	1,12
331. karyopherin alpha 2 (RAG cohort 1, importin alpha 1)	BC005978	3838	1,18	-1,42	389. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,73	1,59
332. decorin	AF138303	1634	1,14	1,3	390. glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	AL161952	2752	-1,03	2,23
333. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	AB046400	6317	-1,45	5,46	391. translocase of inner mitochondrial membrane 17 homolog A (yeast)	AK023063	10440	1,03	-1,33
334. plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	1,02	1,65	392. Homo sapiens cDNA FLJ13781 fis, clone PLACE4000465	AK023843		1,36	1,09
335. nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	D21262	9221	1,28	-1,81	393. superoxide dismutase 2, mitochondrial	W46388	6648	1,08	4,08
336. leucine-rich PPR-motif containing	A1653608	10128	-1,01	-1,55	394. phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	AV721177	8301	1,15	1,54
337. Homo sapiens cDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122	AK026168		-1,21	1,35	395. peroxisome receptor 1	AW468717	5830	-1,9	-1,51
338. SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily e, member 1	NM_003079	6605	1,41	-1,09	396. tr75d05.x1 NCI_CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2224137				
339. ras homolog gene family, member B	A1263909	388	-1,14	1,56	397. phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	A1590053		1,13	1,49
340. dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,7	-1,03	398. adaptor-related protein complex 1, gamma 1 subunit	AV722190	8301	-1,01	1,45
341. insulin-like growth factor binding protein 3	BF340228	3486	1,13	2,93	399. ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	AL050025	164	-1,25	1,4
342. Homo sapiens mRNA: cDNA DKFZp564F053 (from clone DKFZp564F053)	AL049265		1,16	1,51	400. Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	X63575	491	1,22	4,45
343. homolog of mouse quaking QKI (KH domain RNA binding protein)	AL031781	9444	-1,1	1,39	401. interleukin 1 receptor antagonist	AF222691		1,22	1,42
344. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	NM_030666	1992	1	1,44	402. interleukin 1 receptor antagonist	BE563442	3557	1,05	1,48
345. FK506 binding protein 1A (12kD)	BC001002	2280	-1,01	-1,41	403. similar to prothymosin alpha	BE563442	3557	1,08	1,46
346. 601469954F1 NIH_MGC_67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3873157 5'	BE780075		1,3	-1,05	404. putative zinc finger protein from EUROMAGE 566589	AF257099		1,11	-1,32
347. myosin IB	BF432550	4430	1,13	1,42	405. superoxide dismutase 2, mitochondrial	AL121585	58495	1,3	-1,09
348. myosin IB	BF215996	4430	1,04	1,32	406. proline-rich protein BstNI subfamily 4	X15132	6648	1,23	4,64
349. similar to HYPOTHETICAL 34.0 KDA PROTEIN ZK795.3 IN CHROMOSOME IV	BE747342	92856	1,11	-1,53	407. small nuclear ribonucleoprotein polypeptide A'	X07882		1,16	-1,3
350. z50c12.s1 Soares_pregnant_uterus_NbHPU Homo sapiens cDNA clone IMAGE:505366 3'	AA156240		1,18	1,79	408. homocysteine-inducible, endoplasmic reticulum stress-inducible, ubiquitin-like domain member 1	AJ130972	6627	1,03	-1,36
351. neural precursor cell expressed, developmentally down-regulated 4-like fibronectin 1	A1357376	23327	1,05	1,66	409. glutamate-ammonia ligase (glutamine synthase)	AF217990	9709	-1,19	1,73
352. fibronectin 1	X02761	2335	1,1	1,38	410. discs, large homolog 1 (Drosophila)	U08626	2752	-1,07	2,22
353. phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein	AL135735	8301	1	1,37	411. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 13	AL121981		1,99	1,24
354. lipocalin 2 (oncogene 24p3)	NM_005564	3934	-1,32	5,02	412. hypothetical protein [Methanothermobacter thermautotrophicus str. Delta H]	AJ001698	5275	1,21	-1,76
355. KIAA0993 protein	AL536319	23001	2,3	1,68	413. major histocompatibility complex, class I, J (pseudogene)	S81916		-1,06	1,32
356. interleukin 1 receptor antagonist	U65590	3557	-1,08	1,41	414. chloride channel, calcium activated, family member 2	M80469	3137	-1,08	1,33
357. interleukin 1 receptor antagonist	AW083357	3557	1,09	1,6	415. zu53c08.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone IMAGE:741710 3' similar to contains Alu repetitive element	BF0003134	9635	1,1	-1,42
358. ras homolog gene family, member E	BG054844	390	1,41	1,33	416. PAI-1 mRNA-binding protein	AA401963		1,64	1,54
359. AL520675 Homo sapiens NEUROBLASTOMA COT 10-NORMALIZED	AL520675		-1,87	-1,14	417. PAI-1 mRNA-binding protein	AF131807	26135	1,16	-1,39
360. cysteinyl-HRNA synthetase	A1769685	833	1,1	1,39	418. PP1201 protein	NM_015640	26135	1,25	-1,51
361. Rho-specific guanine nucleotide exchange factor p114	AB011093	23370	-1,1	1,42	419. pre-B-cell colony-enhancing factor	NM_022152	64114	1,16	1,31
362. wq89h08.x1 NCI_CGAP_GC6 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2479263	A1970157		1,1	-1,9	420. pre-B-cell colony-enhancing factor	BF575514	10135	1,16	2,07
					421. zinc finger protein 216	NM_005746	10135	1,02	1,43
						AW471220	7763	-1,16	1,48

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinozyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinozyten (HGF), ^{KGF}Keratinozyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinozyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle K: Zielgene von KGF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 135

Gen	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B	Gen	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
422. CGI-127 protein	NM_016061	51646	-1,03	1,71	466. epithelial protein up-regulated in carcinoma, membrane associated protein	NM_005764	10158	-1,41	2,74
423. ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	NM_003344	7328	1,2	1,35	467. claudin 15	NM_014343	24146	-1,31	1,1
424. HSPC028 protein	NM_014038	28969	-1,02	-1,61	468. hypothetical protein FLJ10116	NM_018000	55686	1,01	1,6
425. chromatin-specific transcription elongation factor, 140 kDa subunit	NM_007192	11198	-1,1	-1,47	469. hypothetical protein FLJ22622	NM_025151	80223	1,2	1,39
426. TRK-fused gene	NM_006070	10342	1,04	1,38	470. hypothetical protein FLJ22792	NM_024921	79983	1,16	1,65
427. putative nucleotide binding protein, estradiol-induced	NM_014366	26354	1,16	-1,7	471. solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter), member 14	NM_007231	11254	-1,08	2,38
428. MO25 protein	NM_016289	51719	1,17	1,37	472. hypothetical protein MGC10796	NM_024508	79413	-1,07	1,48
429. transcription factor-like 4	BF056105	6945	1,4	-1,13	473. ets homologous factor	NM_012153	26298	1,13	1,6
430. mitochondrial ribosomal protein L42	BE782148	28977	-1,04	-1,41	474. hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,32	-1,02
431. nerve growth factor receptor (TNFRSF16) associated protein 1	NM_014380	27018	-1,14	-1,33	475. interleukin 23, alpha subunit p19	NM_016584	51561	-1,07	3,46
432. CGI-44 protein; sulfide dehydrogenase like (yeast)	NM_021199	58472	1,07	1,33	476. mucin 16	NM_024690	94025	1,96	-2,32
433. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK)	NM_004887	9547	-1,76	-1,53	477. cytochrome b5 reductase b5R.2	NM_016229	51700	-1,07	1,34
434. hypothetical protein PRO1068	NM_018573	55439	1,43	1,26	478. hypothetical protein FLJ20207	NM_017711	54857	1,05	1,44
435. uncharacterized hypothalamus protein HSMNP1	NM_018478	55861	1,09	1,4	479. interleukin-1 homolog 1	NM_019618	56300	-1,02	2,81
436. ADP-ribosylation factor-like 5	NM_012097	26225	1,15	-1,41	480. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	-1,76	2,36
437. G protein-coupled receptor kinase 7	NM_017572	28772	1,38	2,55	481. NICE-1 protein	NM_019060	54544	1,12	1,65
438. hypothetical protein DKFZp761H221	NM_017601	54772	-1,12	-1,35	482. E2IG2 protein	NM_016565	51287	-1,18	-1,64
439. G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	1,04	-1,35	483. transcription factor BMAL2	NM_020183	56938	1,21	1,51
440. G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	1,17	-1,55	484. small proline-rich protein 2C	NM_006518	6702	1,03	4,24
441. H2A histone family, member O	NM_003516	8337	-1,03	1,31	485. 60S acidic ribosomal protein PO	NM_016183	51154	1,06	-1,71
442. translocase of inner mitochondrial membrane 8 homolog B (yeast)	NM_012459	26521	-1,03	-1,35	486. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,14	-1,36
443. hypothetical protein FLJ22969	NM_022842	64866	1,02	1,3	487. amino acid transporter 2	NM_018976	54407	1,3	1,11
444. ERO1-like (S. cerevisiae)	NM_014584	30001	1,25	3,1	488. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-1,25	-1,82
445. trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,46	-1,16	489. hypothetical protein MGC5618	BF575213	79099	-1,01	4,57
446. hypothetical protein MGC5585	NM_024057	79023	-1,06	-1,6	490. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	AL132665	665	1,29	2,63
447. hypothetical protein PP5395	NM_021732	60370	-1,09	1,65	491. BCL2/adenovirus E1B 19kD interacting protein 3-like	AF060922	665	1,13	2,53
448. pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	1,1	5,5	492. leucine carboxyl methyltransferase	BC001214	51451	1,08	1,54
449. Huntingtin interacting protein K	NM_016400	25764	-1,04	-1,32	493. HSPC133 protein	AF201938	29081	-1,14	-1,3
450. platelet derived growth factor C	NM_016205	56034	1,17	1,47	494. protein associated with PRK1	AL136598	54469	1,04	1,38
451. hypothetical protein FLJ20258	NM_017729	54869	1,06	1,38	495. hypothetical protein FLJ20258	AF282167	54869	1,05	1,47
452. hook2 protein	NM_013312	29911	1,53	-1,25	496. hypothetical protein FLJ20258	BC004907	54869	1,05	1,59
453. hypothetical protein FLJ20116	NM_017671	55612	-1,15	1,4	497. ELK3, ETS-domain protein (SRF accessory protein 2)	AW575374	2004	1,19	1,54
454. hypothetical protein FLJ23231	NM_025079	80149	1,06	2,14	498. AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		1,11	1,36
455. hypothetical protein	NM_016629	51323	-1,03	-1,46	499. Kruppel-like factor 4 (gut)	BF514079	9314	-1,2	1,44
456. malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,12	-1,98	500. heat shock 70kD protein 8	AA704004	3312	1,05	-1,36
457. small proline-rich protein 3	NM_005416	6707	-1,14	1,5	501. oy31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-2,86	5,36
458. hypothetical protein FLJ10901	NM_018265	55765	1,07	1,33	502. leucine-rich repeat protein, neuronal 1	AI631881	4034	-1,3	1
459. CGI-115 protein	NM_016052	51018	1,1	-2,44	503. ubiquitin-conjugating enzyme E2H (UBC8 homolog, yeast)	AI829920	7328	1,06	1,61
460. RAB38, member RAS oncogene family	NM_022337	23682	1,07	-1,4	504. DKFZP586L0724 protein	AU158148	25926	1,07	-1,52
461. triggering receptor expressed on myeloid cells 1	NM_018643	54210	-1,2	-2,45	505. H1 histone family, member 4	AL353759	3008	-1,22	1,33
462. cysteine-rich hydrophobic domain 2	NM_012110	26511	-1,14	1,37	506. Rac GTPase activating protein 1	AU153848	29127	-1,05	-1,66
463. hypothetical protein FLJ21870	NM_023016	65124	-1,01	1,3					
464. Rh type C glycoprotein	NM_016321	51458	-1,29	2,59					
465. RAB3A interacting protein (rab3n3)-like 1	NM_013401	5866	-1,44	1,05					

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienen die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Tabelle L: Zielgene von GM-CSF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Gene	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B	Gene	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
1. histone acetyltransferase	NM_007067	11143	-1,31	-1,11	57. protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	-1,39	-1,18
2. paired box gene 8	X69699	7849	-1,31	1,04	58. calbindin 2, (29kD, calretinin)	NM_001740	794	-1,39	1,08
3. hypothetical protein FLJ23282	AV001436	79874	-1,34	1,05	59. aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	NM_000694	221	-1,87	1,05
4. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U (scaffold attachment factor A)	NM_004501	3192	-1,32	1,12	60. protocadherin gamma subfamily C, 3	NM_002588	5098	-1,45	-1,08
5. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 10 (theta, 150/170kD)	NM_003750	8661	1,37	-1,01	61. nucleolar and coiled-body phosphoprotein 1	NM_004741	9221	1,47	1,01
6. RAD21 homolog (S. pombe)	NM_006265	5885	1,67	1,22	62. keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,33	1,11
7. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,32	1,01	63. lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,31	1,01
8. membrane component, chromosome 11, surface marker 1	NM_005898	4076	1,31	-1,02	64. development and differentiation enhancing factor 2	NM_003887	8853	1,29	-1,6
9. GNAS complex locus	NM_000516	2778	-1,43	-1,08	65. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,41	-1,12
10. ribosomal protein S10	NM_001014	6204	-1,3	-1,13	66. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,19	1,3
11. 15 kDa selenoprotein	NM_004261	9403	1,33	-1,06	67. protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,45	-1,06
12. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	NM_006805	10949	-1,36	-1,01	68. rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2	NM_004723	9181	-1,37	-1,02
13. poly(A) binding protein, cytoplasmic 4 (inducible form)	NM_003819	8761	1,38	-1,01	69. keratin 13	NM_002274	3860	1,51	1,05
14. chromobox homolog 3 (HP1 gamma homolog, Drosophila)	BE748755	11335	1,42	-1,08	70. gap junction protein, alpha 7, 45kD (connexin 45)	NM_005497	10052	-1,6	2,67
15. basic helix-loop-helix domain containing, class B, 2	NM_003670	8553	1,01	-1,38	71. transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,31	1,18
16. synaptophysin-like protein	NM_006754	6856	1,49	1,03	72. voltage-dependent anion channel 3	BC002456	7419	1,39	-1,08
17. epithelial membrane protein 1	NM_001423	2012	1,31	-1,02	73. voltage-dependent anion channel 3	U90943	7419	-1,1	1,51
18. Ras-GTPase-activating protein SH3-domain-binding protein	BG500067	10146	1,33	-1,01	74. complement component 1, q subcomponent binding protein	L04636	708	1,41	1,05
19. golgi autoantigen, golgin subfamily a, 4	NM_002078	2803	1,48	-1,08	75. ring finger protein 11	AB024703	26994	1,4	-1,1
20. cornichon-like	NM_005776	10175	1,38	1,11	76. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,54	-1,08
21. DNA (cytosine-5-)-methyltransferase 1	NM_001379	1786	1,56	-1,1	77. melanoma antigen, family D, 1	AF217963	9500	-1,34	1,01
22. EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1	AI826799	2202	1,41	-1,04	78. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BF248165	10605	-1,35	1,01
23. ribonucleotide reductase M2 polypeptide	BE966236	6241	1,38	-1,01	79. protocadherin gamma subfamily A, 1	AF152318	56114	-1,39	-1,11
24. peroxiredoxin 4	NM_006406	10549	1,32	1,05	80. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,31	-1,15
25. paired basic amino acid cleaving enzyme (furin, membrane associated receptor protein)	NM_002569	5045	-1,45	1,08	81. Microfibril-associated glycoprotein-2	U37283	8076	1,43	1,02
26. tumor necrosis factor alpha-inducible cellular protein containing leucine zipper domains; Huntingtin interacting protein L; transcription factor IIIA-interacting protein	NM_021980	10133	-1,3	-1,02	82. microfibrillar-associated protein 2	AL049569	4237	-1,3	1
27. tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,4	-1,21	83. tumor suppressing subtransferable candidate 3	AF001294	7262	1,37	1,06
28. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	NM_003367	7392	-1,34	1,08	84. calmodulin-like 3	M58026	810	-1,5	-1,08
29. peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	NM_000919	5066	1,35	-1,01	85. chromosome 20 open reading frame 1	AF098158	22974	1,4	1,04
30. fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,37	-1,04	86. uroplakin 1B	NM_006952	7348	1,31	1,08
31. Notch homolog 2 (Drosophila)	AA291203	4853	-1,07	1,31	87. nuclear receptor coactivator 1	U59302	8648	-2,16	1,71
32. discs, large (Drosophila) homolog 1	AW139131	1739	1,46	1,08	88. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BC005295	10605	-1,5	-1,08
33. RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1	NM_002890	5921	1,17	-1,3	89. four and a half LIM domains 1	AF098518	2273	-1,35	-1,03
34. insulin-like growth factor binding protein 2 (36kD)	NM_000597	3485	-1,6	1,25	90. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,4	1,02
35. 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	NM_000191	3155	-1,34	-1	91. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,1	1,55
36. SKIP for skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase	NM_016532	51763	-1,4	-1,09	92. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	2,52	1,36
37. transcription elongation factor B (SIII), polypeptide 3 (110kD, elongin A)	AI344128	6924	-1,33	-1,02	93. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	M19156	3858	-1,36	-1,18
38. interleukin 8	NM_000584	3576	1,37	-1,2	94. inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	3,4	1,49
39. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	D86043	8194	-1,48	-1,11	95. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		-1,24	-1,48
40. nucleoporin 88kD	NM_002532	4927	-1,33	1,12	96. interleukin 13 receptor, alpha 1	U81380	3597	-1,84	1,29
41. fibulin 5	NM_006329	10516	-1,61	1,09	97. protocadherin gamma subfamily C, 3	BC006439	5098	-1,64	-1,11
42. tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,45	1,12	98. folate receptor 1 (adult)	AF000381		1,09	-1,34
43. NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 3 (12kD, B12)	NM_002491	4709	1,43	-1,06	99. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	AF115544	1029	-1,47	1,03
44. STAT induced STAT inhibitor-2	AB004903	8835	1,34	1,88	100. annexin A2 pseudogene 3	M62895	305	1,48	-1,08
45. splicing factor, arginine/serine-rich 5	NM_006925	6430	1,05	1,33	101. granulin	BC000324	2896	-1,35	1,08
46. hairy homolog (Drosophila)	NM_005524	3280	1,36	-1,02	102. interleukin 8	AF043337	3576	1,37	-1,15
47. RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,76	-1,17	103. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,43	-1,16
48. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1,12	-1,31	104. CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	AF349444	23741	1,98	1,06
49. aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	NM_001353	1645	-1,33	-1,08	105. unactive progesterone receptor, 23 kD	BE903880	10728	1,3	-1,29
50. hypothetical protein	NM_013386	29957	1,51	1	106. dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,43	1,01
51. coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001993	2152	1,4	1,09	107. agrin	AW008051	180	1,34	-1,12
52. mitochondrial ribosomal protein 63	NM_024026	78988	1,72	1,06	108. 601469954F1 NIH_MGC_67 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:3873157				
53. KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,43	1,16	109. lysophospholipase I	BE780075		1,32	-1,05
54. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-3,28	1,29	110. ho62c10.x1 Soares_NFL_T_GBC_S1 Homo sapiens cDNA clone	BG288007	10434	1,34	1,1
55. clathrin, light polypeptide (Lcb)	NM_007097	1212	-1,39	-1,03	111. KIAA0356 gene product	AW873564		-1,37	1,11
56. dihydrolipoamide branched chain transacylase (E2 component of branched chain keto acid dehydrogenase complex; maple syrup urine disease)	NM_001918	1629	1,48	1,1	112. SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AB002354	9842	-1,38	-1,02
					113. keratin 4	AJ131244	10802	-1,33	-1,02
						X07695	3851	-1,37	-1,01

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinozyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinozyten (HGF), ^{KGF}Keratinozyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinozyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienen die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinozyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle L: Zielgene von GM-CSF, die in Versuch A oder B aussagekräftig reguliert sind

Anhang 137

Gene	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B	Gene	'gene bank acession no.'	'Locus- Link ID no.'	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
114. carboxylesterase 2 (intestine, liver)	AW157619	8824	1	-1,34	137. zu53c08.s1 Soares ovary tumor NbHOT Homo sapiens cDNA clone	AA401963			
115. ribosomal protein L27	BE312027	6155	-1,32	1,18	IMAGE:741710 3' similar to contains Alu repetitive element			1,63	1,23
116. myosin IF	BF740152	4542	-3,35	1,14	138. chromosome 11 hypothetical protein ORF3	NM_020154	56851	1,33	1,03
117. myosin, light polypeptide 6, alkali, smooth muscle and non-muscle	AA419227	4637	1,44	1,06	139. 40S ribosomal protein S27 isoform	NM_015920	51065	1,32	1,01
118. protein kinase C substrate 80K-H	AI815793	5589	-1,35	-1,02	140. likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60685	-1,43	1,26
119. heat shock 90kD protein 1, alpha	RU1140	3320	1,35	-1,06	141. hypothetical protein FLJ10154	NM_018011	55082	1,38	-1,01
120. trefoil factor 2 (spasmodytic protein 1)	NM_005423	7032	-1,57	-1,11	142. G protein-coupled receptor kinase 7	NM_017572	2872	1,4	1
121. KIAA0328 protein	AB002326	23147	1,81	1,17	143. G protein-binding protein CRFG	NM_012341	23560	1,35	-1,19
122. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	AY007087	7392	-1,45	1,04	144. UDP-glucose ceramide glucosyltransferase-like 1	NM_020120	56886	1,35	1,61
123. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,39	1,4	145. hypothetical protein FLJ11286	NM_018381	55337	1,47	1,1
124. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial- derived neutrophil-activating peptide 78)	BG166705	6374	1,74	-1,43	146. trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,62	-1,11
125. Homo sapiens cDNA FLJ13781 fis, clone PLACE4000465	AK023843		1	1,38	147. hypothetical protein	NM_019000	54463	-1,97	1,13
126. poly(A) binding protein, cytoplasmic, pseudogene 3	U64661	26978	-1,32	-1,01	148. pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	-2,34	1,04
127. Homo sapiens cDNA: FLJ22535 fis, clone HRC13115, highly similar to AF152336 Homo sapiens protocadherin gamma B7 (PCDH-gamma-B7) chromosome 11 open reading frame 9	AK026188		-1,37	-1,03	149. malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,36	-1,95
128. ATPase, Ca++ transporting, plasma membrane 2	AC004770	745	-1,37	1,05	150. CGI-119 protein	NM_016056	51643	1,53	-1
129. Homo sapiens Alu repeat (LNx1)	X63575	491	-3,08	1,74	151. Rh type C glycoprotein	NM_016321	51458	-1,41	-1,06
130. Homo sapiens Alu repeat (LNx1)	AF222691		1,45	1,21	152. RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1	NM_013401	5866	-1,38	1,11
131. polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide J (13.3kD)	AW402635	5439	-1,05	-1,53	153. claudin 15	NM_014343	24146	-1,66	1,03
132. breast carcinoma amplified sequence 4, thymosin-like 6	AL133228		1,37	1,03	154. erythroid differentiation-related factor	NM_016633	51327	-1,44	-1,03
133. Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	M14087		-1,4	1,03	155. hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,35	-1,03
134. discs, large homolog 1 (Drosophila)	AL121981		2	-1,1	156. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	-3,58	1,54
135. ribosomal protein L15	Z97353	6138	1,4	1,02	157. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,39	-1,07
136. Homo sapiens aconitase precursor (ACON) mRNA, nuclear gene encoding mitochondrial protein	AF086790		-1,38	-1,14	158. natriuretic peptide precursor C	NM_024409	4880	-3,44	1,12
					159. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		1,43	1,5
					160. ribulose-5-phosphate-3-epimerase	BE964473	6120	1,65	1,07
					161. y31h06.x1 Soares parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-1,73	1,25

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Tabelle M: Gemeinsame Zielgene von HGF und KGF

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
1. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	AL021977	23764	1,54	2	1,13	2,12
2. hypothetical protein FLJ20258	AI219073	54869	1,32	-1,21	1,18	1,36
3. high density lipoprotein binding protein (vigilin)	NM_005336	3069	1,31	1,03	1,33	1,18
4. procollagen-proline, 2-oxoglutarate 4-dioxygenase (proline 4-hydroxylase), beta polypeptide (protein disulfide isomerase; thyroid hormone binding protein p55)	NM_000918	5034	1,5	1,21	1,18	1,3
5. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,35	1,1	1,32	1,36
6. myeloid cell leukemia sequence 1 (BCL2-related)	BF594446	4170	-1,1	1,56	1,09	1,52
7. heat shock 70kD protein 1A	NM_005345	3303	-1,33	1,08	1,41	1,05
8. B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	AL535380	694	-1,02	1,32	-1,02	1,86
9. cytoskeleton-associated protein 4	AW029619	10970	-1,42	1,24	-1,44	1,01
10. cytoskeleton-associated protein 4	NM_006825	10970	-1,29	-1,34	-1,33	-1,2
11. dual specificity phosphatase 1	NM_004417	1843	1,36	1,35	-1,21	1,35
12. ATP citrate lyase	NM_001096	47	1,34	1,1	1,14	-1,34
13. thioredoxin reductase 1	NM_003330	7296	1,23	1,32	1,13	1,33
14. claudin 4	NM_001305	1364	-1,05	1,52	-1,2	1,62
15. aminopeptidase puromycin sensitive	AJ132583	9520	1,34	1,17	1,19	1,45
16. GAP-associated tyrosine phosphoprotein p62 (Sam68)	BC000717	10657	-1,36	-1,06	-1,3	-1,06
17. peptidylprolyl isomerase F (cyclophilin F)	BC005020	10105	1,39	1,18	1,14	1,37
18. keratin 19	NM_002276	3880	1,62	1,31	1,44	1,57
19. tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,56	1,14	1,23	1,37
20. casein kinase 1, epsilon	NM_001894	1454	-1,19	1,64	-1,29	1,5
21. fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,59	-1,02	-1,34	-1,22
22. TGFβ inducible early growth response	NM_005655	7071	1,17	1,97	1,15	1,8
23. DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box polypeptide 9 (RNA helicase A, nuclear DNA helicase II; leukophysin)	NM_001357	1660	1,39	-1,04	1,47	-1,19
24. v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)	NM_002467	4609	-1,35	-1,13	-1,07	-1,62
25. discs, large (Drosophila) homolog 1	BG251175	1739	1,41	1,16	1,6	1,24
26. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	AI738896	7128	1,62	1,35	1,32	1,86
27. tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3	NM_006290	7128	1,64	1,3	1,13	1,55
28. cyclin G2	NM_004354	901	1,14	1,71	-1,02	1,82
29. interleukin 8	NM_000584	3576	1,63	-1,08	1,45	1,81
30. tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,48	1,12	-1,32	-1,08
31. EphA2	NM_004431	1969	1,44	1,25	1,05	1,43
32. RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,72	1,13	1,54	1,12
33. laminin, alpha 3 (nicein (150kD), kalinin (165kD), BM600 (150kD), epilegrin)	NM_000227	3909	1,34	1,11	1,23	1,4
34. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1,36	1,13	1,09	1,54
35. thrombomodulin	NM_000361	7056	-1,54	1,01	-1,44	-1,13
36. GRO1 oncogene (melanoma growth stimulating activity, alpha)	NM_001511	2919	1,34	-1,1	1,17	1,49
37. matrix metalloproteinase 1 (interstitial collagenase)	NM_002421	4312	1,13	1,47	-1,16	1,75
38. KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,87	1,07	-1,45	1,24
39. prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (prostaglandin G/H synthase and cyclooxygenase)	NM_000963	5743	1,22	1,99	-1,03	1,34
40. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-1,78	-1,11	-1,89	-1,05
41. α disintegrin and metalloproteinase domain 8	NM_001109	101	1,49	1,19	1,3	1,37
42. v-maf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog F (avian)	NM_012323	23764	1,2	1,54	1,15	1,64
43. small inducible cytokine subfamily A (Cys-Cys), member 20	NM_004591	6364	1,55	2,69	-1,05	6,3
44. transcobalamin I (vitamin B12 binding protein, R binder family)	NM_001062	6947	-1,38	-1,34	-1,4	-1,17
45. bone morphogenetic protein 1	NM_001199	649	1,13	-1,52	-1,53	1,13
46. matrix metalloproteinase 10 (stromelysin 2)	NM_002425	4319	1,63	1,39	1,15	2,24
47. tuftelin 1	NM_020127	7286	1,29	1,58	1,07	1,44
48. keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,4	-1,08	-1,35	-1,14
49. lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,34	-1,13	-1,45	-1,02
50. parathyroid hormone-like hormone	NM_002820	5744	1,41	1,49	1,23	-1,6
51. lectin, galactoside-binding, soluble, 7 (galectin 7)	NM_002307	3963	-1,43	-1,52	-1,47	-1,57
52. bone morphogenetic protein 1	NM_006128	649	-1,14	-1,63	-1,63	1,01
53. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,45	-1,32	-1,28	-1,69
54. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,28	1,54	1,3	1,05
55. protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,4	-1,09	-1,36	-1,11
56. laminin, gamma 2 (nicein (100kD), kalinin (105kD), BM600 (100kD), Herlitz junctional epidermolysis bullosa)	NM_018891	3918	1,43	1,52	1,16	1,51
57. transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,25	1,48	1,34	-1,03
58. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,64	-1,06	1,59	-1,24
59. up-regulated by BCG-CWS	AB040120	64116	1,43	1,18	1,42	-1,19
60. laminin, beta 3 (nicein (125kD), kalinin (140kD), BM600 (125kD))	L25541	3914	1,32	1,21	1,13	1,48
61. smoothenin	AF064238	6525	1,34	1	-1,01	1,3
62. alpha-actinin-2-associated LIM protein	AF002280	27295	1,15	2,43	3,43	1,31
63. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	U19556	6317	-1,34	-1,18	-1,28	1,43
64. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,36	-1,38	-1,37	1,41

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle M: Gemeinsame Zielgene von HGF und KGF

Anhang 139

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF B c-jun ^{-/-} B
65. calmodulin-like 3	M58026	810	-1,49	-1,32	-1,52	-1,66
66. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,53	-1,18	-1,35	1,58
67. inhibin, beta A (activin A, activin AB alpha polypeptide)	M13436	3624	1,64	2,19	-1,14	1,9
68. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,12	1,4	1,02	1,97
69. inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	-1,11	-1,91	7,07	-2,26
70. plasminogen activator, urokinase receptor	U08839	5329	1,92	1,85	-1,05	1,63
71. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		1,32	1,15	-1,13	2,22
72. folate receptor 1 (adult)	AF000381		-2,29	-1,23	1,92	-1,25
73. interleukin 8	AF043337	3576	1,59	-1,18	1,26	2,11
74. cyclin G2	L49506	901	1,32	1,3	-1,05	1,77
75. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,47	-1,47	-1,43	-1,09
76. plasminogen activator, urokinase	K03226	5328	1,35	1,2	1,12	1,52
77. Homo sapiens PNAS-20	AF274945		-1,77	1,08	2,54	7,51
78. parathyroid hormone-like hormone	BC005961	5744	1,53	1,32	1,17	-1,7
79. plasminogen activator, urokinase receptor	AY029180	5329	1,62	2,1	1,02	1,65
80. Homo sapiens cDNA: FLJ22515 fis, clone HRC12122	AK026168		-1,11	-1,66	-1,21	1,35
81. ras homolog gene family, member B	AI263909	388	1,16	1,72	-1,14	1,56
82. dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,49	-1,04	-1,7	-1,03
83. fibronectin 1	X02761	2335	1,31	-1,02	1,1	1,38
84. interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	AA749101	8519	-1,11	-1,3	-1,46	-1,05
85. ADP-ribosylation factor 6	AA243143	382	-1,47	-1,31	-1,09	-1,49
86. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,49	1,28	1,73	1,59
87. peroxisome receptor 1	AW468717	5830	-1,88	-1,62	-1,9	-1,51
88. tr75d05.x1 NCI_CGAP_Pan1 Homo sapiens cDNA clone IMAGE:2224137 3' similar to contains Alu repetitive element	AI590053		1,07	1,3	1,13	1,49
89. Homo sapiens Alu repeat (LNK1)	AF222691		1,12	1,42	1,22	1,42
90. proline-rich protein BstNI subfamily 4	X07882		-1,2	-1,34	1,16	-1,3
91. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 14 (BRAK)	NM_004887	9547	-1,72	-1,28	-1,76	-1,53
92. trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,54	-1,23	-1,46	-1,16
93. pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	-2,7	1,59	1,1	5,5
94. malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,2	-2,03	-1,12	-1,98
95. RAB38, member RAS oncogene family	NM_022337	23682	1,06	-1,32	1,07	-1,4
96. hypothetical protein FLJ21870	NM_023016	65124	1,27	1,4	-1,01	1,3
97. claudin 15	NM_014343	24146	-1,58	1,02	-1,31	1,1
98. hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,34	1,05	1,32	-1,02
99. mucin 16	NM_024690	94025	-1,39	-4,14	1,96	-2,32
100. hypothetical protein FLJ22795	NM_025084	80154	-3,04	2,2	-1,76	2,36
101. NICE-1 protein	NM_019060	54544	1,4	-1	1,12	1,65
102. inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,43	-1,1	-1,14	-1,36
103. Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-2,04	-1,73	-1,25	-1,82
104. hypothetical protein FLJ20258	BC004907	54869	1,64	1,08	1,05	1,59
105. AV741657 CB Homo sapiens cDNA clone CBMALG01 5'	AV741657		1,35	1,31	1,11	1,36
106. y31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-1,77	1,42	-2,86	5,36
107. leucine-rich repeat protein, neuronal 1	AI631881	4034	-1,31	-1,03	-1,3	1

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), c-jun^{-/-} Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der c-jun^{-/-} Keratinocyten als Referenzwerte.



Tabelle N: Gemeinsame Zielgene von HGF und GM-CSF

Gen	'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
1. histone acetyltransferase	NM_007067	11143	-1,4	-1,45	-1,31	-1,11
2. paired box gene 8	X69699	7849	-1,38	-1,07	-1,31	1,04
3. hypothetical protein FLJ23282	AW001436	79874	-1,36	-1,04	-1,34	1,05
4. pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,35	1,1	1,32	1,01
5. membrane component, chromosome 11, surface marker 1	NM_005898	4076	1,43	1,05	1,31	-1,02
6. GNAS complex locus	NM_000516	2778	-1,34	-1,06	-1,43	-1,08
7. ribosomal protein S10	NM_001014	6204	-1,37	-1,14	-1,3	-1,13
8. heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A0	NM_006805	10949	-1,44	1,11	-1,36	-1,01
9. paired basic amino acid cleaving enzyme (furin, membrane associated receptor protein)	NM_002569	5045	-1,39	-1,11	-1,45	1,08
10. tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,56	1,14	1,4	-1,21
11. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	NM_003367	7392	-1,34	-1,12	-1,34	1,08
12. peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase	NM_000919	5066	1,34	-1,04	1,35	-1,01
13. fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,59	-1,02	-1,37	-1,04
14. discs, large (Drosophila) homolog 1	AW139131	1739	1,46	1,16	1,46	1,08
15. insulin-like growth factor binding protein 2 (36kD)	NM_000597	3485	-1,72	1,12	-1,6	1,25
16. 3-hydroxymethyl-3-methylglutaryl-Coenzyme A lyase (hydroxymethylglutaricaciduria)	NM_000191	3155	-1,43	-1,09	-1,34	-1
17. SKIP for skeletal muscle and kidney enriched inositol phosphatase	NM_016532	51763	-1,46	-1,09	-1,4	-1,09
18. interleukin 8	NM_000584	3576	1,63	-1,08	1,37	-1,2
19. protein tyrosine phosphatase, non-receptor type substrate 1	D86043	8194	-1,42	-1,04	-1,48	-1,11
20. nucleoporin 88kD	NM_002532	4927	-1,4	1,22	-1,33	1,12
21. fibulin 5	NM_006329	10516	-1,86	-1,05	-1,61	1,09
22. tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,48	1,12	-1,45	1,12
23. RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,72	1,13	1,76	-1,17
24. diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1,36	1,13	1,12	-1,31
25. aldo-keto reductase family 1, member C1 (dihydrodiol dehydrogenase 1; 20-alpha (3-alpha)-hydroxysteroid dehydrogenase)	NM_001353	1645	-1,51	-1,04	-1,33	-1,08
26. coagulation factor III (thromboplastin, tissue factor)	NM_001993	2152	1,36	1,27	1,4	1,09
27. KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,87	1,07	-1,43	1,16
28. O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-1,78	-1,11	-3,28	1,29
29. protease, serine, 2 (trypsin 2)	NM_002770	5645	-1,42	-1,4	-1,39	-1,18
30. keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,4	-1,08	-1,33	1,11
31. lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,34	-1,13	-1,31	1,01
32. development and differentiation enhancing factor 2	NM_003887	8853	1,45	-1,27	1,29	-1,6
33. keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,45	-1,32	-1,41	-1,12
34. transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,28	1,54	1,19	1,3
35. protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,4	-1,09	-1,45	-1,06
36. keratin 13	NM_002274	3860	1,7	1,38	1,51	1,05
37. transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,25	1,48	1,31	1,18
38. ring finger protein 11	AB024703	26994	1,34	-1,14	1,4	-1,1
39. eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,64	-1,06	1,54	-1,08
40. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BF248165	10605	-1,4	1,07	-1,35	1,01
41. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,36	-1,38	-1,31	-1,15
42. Microfibril-associated glycoprotein-2	U37283	8076	1,4	1,07	1,43	1,02
43. microfibrillar-associated protein 2	AL049569	4237	-1,81	-1,27	-1,3	1
44. tumor suppressing subtransferable candidate 3	AF001294	7262	1,46	-1,09	1,37	1,06
45. calmodulin-like 3	M58026	810	-1,49	-1,32	-1,5	-1,08
46. uroplakin 1B	NM_006952	7348	1,33	1,1	1,31	1,08
47. polyadenylate binding protein-interacting protein 1	BC005295	10605	-1,44	-1,07	-1,5	-1,08
48. four and a half LIM domains 1	AF098518	2273	-1,38	-1,1	-1,35	-1,03
49. serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,53	-1,18	-1,4	1,02
50. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,12	1,4	-1,1	1,55
51. spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,05	-2,23	2,52	1,36
52. inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	-1,11	-1,91	3,4	1,49
53. apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891	132	1,32	1,15	-1,24	-1,48
54. interleukin 13 receptor, alpha 1	U81380	3597	-2,18	1,28	-1,84	1,29
55. folate receptor 1 (adult)	AF000381		-2,29	-1,23	1,09	-1,34
56. cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (melanoma, p16, inhibits CDK4)	AF115544	1029	-1,45	1,07	-1,47	1,03
57. interleukin 8	AF043337	3576	1,59	-1,18	1,37	-1,15
58. cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,47	-1,47	-1,43	-1,16
59. CREBBP/EP300 inhibitory protein 1	AF349444	23741	1,78	1,14	1,98	1,06
60. dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,49	-1,04	-1,43	1,01
61. SEC24 related gene family, member A (S. cerevisiae)	AJ131244	10802	-1,33	-1,06	-1,33	-1,02
62. myosin IF	BF740152	4542	-2,98	1,95	-3,35	1,14
63. trefoil factor 2 (spasmolytic protein 1)	NM_005423	7032	-1,54	-1,15	-1,57	-1,11
64. upstream transcription factor 2, c-fos interacting	AY007087	7392	-1,39	-1,15	-1,45	1,04
65. phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,49	1,28	1,39	1,4
66. small inducible cytokine subfamily B (Cys-X-Cys), member 5 (epithelial-derived neutrophil-activating peptide 78)	BG166705	6374	1,73	1,02	1,74	-1,43
67. poly(A) binding protein, cytoplasmic, pseudogene 3	U64661	26978	-1,38	1,05	-1,32	-1,01
68. chromosome 11 open reading frame 9	AC004770	745	-1,54	1,06	-1,37	1,05
69. Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		1,12	1,42	1,45	1,21
70. breast carcinoma amplified sequence 4, thymosin-like 6	AL133228		1,33	-1,01	1,37	1,03

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dienten die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.



Fortsetzung von Tabelle N: Gemeinsame Zielgene von HGF und GM-CSF

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
71.	Human HL14 gene encoding beta-galactoside-binding lectin, 3' end, clone 2	M14087		-1,36	1,04	-1,4	1,03
72.	Homo sapiens aconitase precursor (ACON)	AF086790		-1,43	-1,21	-1,38	-1,14
73.	40S ribosomal protein S27 isoform	NM_015920	51065	1,36	1,28	1,32	1,01
74.	likely ortholog of mouse testis expressed gene 27	NM_021943	60685	-1,58	1,62	-1,43	1,26
75.	trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,54	-1,23	-1,62	-1,11
76.	pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	-2,7	1,59	-2,34	1,04
77.	malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,2	-2,03	-1,36	-1,95
78.	claudin 15	NM_014343	24146	-1,58	1,02	-1,66	1,03
79.	erythroid differentiation-related factor	NM_016633	51327	-1,46	1,04	-1,44	-1,03
80.	hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,34	1,05	1,35	-1,03
81.	hypothetical protein FLJ2795	NM_025084	80154	-3,04	2,2	-3,58	1,54
82.	inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,43	-1,1	-1,39	-1,07
83.	Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-2,04	-1,73	1,43	1,5
84.	y31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-1,77	1,42	-1,73	1,25



Tabelle O: Gemeinsame Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF

Gen		'gene bank accession no.'	'LocusLink ID no.'	HGF A c-jun ^{-/-} A	HGF B c-jun ^{-/-} B	KGF A c-jun ^{-/-} A	KGF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF A c-jun ^{-/-} A	GM-CSF B c-jun ^{-/-} B
1.	pituitary tumor-transforming 1 interacting protein	NM_004339	754	1,35	1,1	1,32	1,36	1,32	1,01
2.	tight junction protein 2 (zona occludens 2)	NM_004817	9414	1,56	1,14	1,23	1,37	1,4	-1,21
3.	fatty acid binding protein 5 (psoriasis-associated)	NM_001444	2171	-1,59	-1,02	-1,34	-1,22	-1,37	-1,04
4.	interleukin 8	NM_000584	3576	1,63	1,08	1,45	1,81	1,37	-1,2
5.	tissue inhibitor of metalloproteinase 2	NM_003255	7077	-1,48	1,12	-1,32	-1,08	-1,45	1,12
6.	RNA 3'-terminal phosphate cyclase	NM_003729	8634	1,72	1,13	1,54	1,12	1,76	-1,17
7.	diphtheria toxin receptor (heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor)	NM_001945	1839	1,36	1,13	1,09	1,54	1,12	-1,31
8.	KIAA0537 gene product	NM_014840	9891	-1,87	1,07	-1,45	1,24	-1,43	1,16
9.	O-6-methylguanine-DNA methyltransferase	NM_002412	4255	-1,78	-1,11	-1,89	-1,05	-3,28	1,29
10.	keratin 1 (epidermolytic hyperkeratosis)	NM_006121	3848	-1,4	-1,08	-1,35	-1,14	-1,33	1,11
11.	lymphocyte antigen 6 complex, locus D	NM_003695	8581	-1,34	-1,13	-1,45	-1,02	-1,31	1,01
12.	keratin 10 (epidermolytic hyperkeratosis; keratosis palmaris et plantaris)	NM_000421	3858	-1,45	-1,32	-1,28	-1,69	-1,41	-1,12
13.	transferrin receptor (p90, CD71)	NM_003234	7037	1,28	1,54	1,3	1,05	1,19	1,3
14.	protease, serine, 3 (trypsin 3)	NM_002771	5646	-1,4	-1,09	-1,36	-1,11	-1,45	-1,06
15.	transferrin receptor (p90, CD71)	BC001188	7037	1,25	1,48	1,34	-1,03	1,31	1,18
16.	eukaryotic translation initiation factor 3, subunit 1 (alpha, 35kD)	BC002719	8669	1,64	-1,06	1,59	-1,24	1,54	-1,08
17.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 3	BC005224	6317	-1,36	-1,38	-1,37	1,41	-1,31	-1,15
18.	calmodulin-like 3	M58026	810	-1,49	-1,32	-1,52	-1,66	-1,5	-1,08
19.	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 4	U19557	6318	-1,53	-1,18	-1,35	1,58	-1,4	1,02
20.	spermidine/spermine N1-acetyltransferase	M55580	6303	-1,12	1,4	1,02	1,97	-1,1	1,55
21.	inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	AF279372	3705	-1,11	-1,91	7,07	-2,26	3,4	1,49
22.	apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3A	U03891		1,32	1,15	-1,13	2,22	-1,24	-1,48
23.	folate receptor 1 (adult)	AF000381		-2,29	-1,23	1,92	-1,25	1,09	-1,34
24.	interleukin 8	AF043337	3576	1,59	-1,18	1,26	2,11	1,37	-1,15
25.	cholinergic receptor, nicotinic, alpha polypeptide 3	M37981	1136	-1,47	-1,47	-1,43	-1,09	-1,43	-1,16
26.	dystroglycan 1 (dystrophin-associated glycoprotein 1)	AW411370	1605	-1,49	-1,04	-1,7	-1,03	-1,43	1,01
27.	phosphoinositol 3-phosphate-binding protein-2	BC000969	54477	1,49	1,28	1,73	1,59	1,39	1,4
28.	Homo sapiens Alu repeat (LNX1)	AF222691		1,12	1,42	1,22	1,42	1,45	1,21
29.	trichorhinophalangeal syndrome I	NM_014112	7227	-1,54	-1,23	-1,46	-1,16	-1,62	-1,11
30.	pseudouridylate synthase 1	NM_025215	80324	-2,7	1,59	1,1	5,5	-2,34	1,04
31.	malonyl-CoA decarboxylase	NM_012213	23417	-1,2	-2,03	-1,12	-1,98	-1,36	-1,95
32.	claudin 15	NM_014343	24146	-1,58	1,02	-1,31	1,1	-1,66	1,03
33.	hypothetical protein MGC2742	NM_023938	65995	1,34	1,05	1,32	-1,02	1,35	-1,03
34.	hypothetical protein FLJ2795	NM_025084	80154	-3,04	2,2	-1,76	-3,58	1,54	1,54
35.	inorganic pyrophosphatase	NM_006903	27068	-1,43	-1,1	-1,14	-1,36	-1,39	-1,07
36.	Homo sapiens non-functional folate binding protein (HSAF000381)	NM_013307		-2,04	-1,73	-1,25	-1,82	1,43	1,5
37.	y31h06.x1 Soares_parathyroid_tumor_NbHPA Homo sapiens cDNA clone IMAGE:1667483 3'	AI057637		-1,77	1,42	-2,86	5,36	-1,73	1,25

Die Expressionsprofile der hier aufgelisteten Gene werden als Rohdaten (Signalintensitäten) und als relative Vergleichswerte (Quotient der Rohdaten) dargestellt. Die Array-Rohdaten und die entsprechenden Standardfehler (SE) wurden für ^{wt}Keratinocyten (wt), ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten (c-jun^{-/-}), ^{HGF}Keratinocyten (HGF), ^{KGF}Keratinocyten (KGF) und ^{GM-CSF}Keratinocyten (GM-CSF) angegeben. Für die Berechnung der relativen Vergleichswerte dient die Rohdaten der ^{c-jun^{-/-}}Keratinocyten als Referenzwerte.

8.2 Kurzzusammenfassung

HGF (*hepatocyte growth factor*) ist ein pleiotropes Zytokin, das in einer mesenchymal-epithelialen Interaktion an den transmembranen Rezeptor MET bindet, wodurch in der Zielzelle Proliferation, Morphogenese, Angiogenese und Migration stimuliert sowie Apoptose inhibiert werden können. Das HGF/MET-Signaltransduktionssystem beeinflußt somit wesentliche Prozesse der kutanen Wundheilung, wobei die spezifischen molekularen Wirkmechanismen in Abgrenzung zu anderen Zytokinen bislang nicht verstanden sind. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Einfluß von HGF im Vergleich zu KGF und GM-CSF auf das Expressionsmuster in Keratinozyten während der kutanen Wundheilung in einem Kokultur-Wundheilungsmodell analysiert.

Mittels Oligonukleotid-Array-Analysen wurden gemeinsame und spezifische Zielgene von HGF, KGF und GM-CSF identifiziert und deren Regulation exemplarisch an FRA1, CTGF, TNFAIP3, uPAR und K10 in der qPCR bestätigt. Am Beispiel von uPAR wurde nachgewiesen, daß sich die zytokinabhängige mRNA-Syntheseregulation auch auf die Proteinbiosynthese auswirkt. Funktionelle Konsequenzen dieser HGF-abhängigen Genregulation wurden *in vitro* durch einen Migrationstest mit neutralisierendem uPAR-Antikörper belegt. Darüber hinaus konnte die Koexpression von MET und uPAR in aktivierten Keratinozyten der Wundheilung *in vivo* insbesondere innerhalb der ‚migration tongue‘ bei gleichzeitiger Bioverfügbarkeit von HGF nachgewiesen werden. Demnach übt HGF unter der Beteiligung von uPAR wahrscheinlich einen zentralen und spezifischen Einfluß auf die Bildung der ‚migration tongue‘ aus.

In dieser Arbeit wurde ein *in vivo* nahes System etabliert und verifiziert, mit dem der spezifische Einfluß von HGF und anderen wundheilungsrelevanten Zytokinen auf die Expression von Zielgenen in primären Keratinozyten analysiert werden kann. Am Beispiel von uPAR wurde gezeigt, daß die Expression der identifizierten Zielgene von zentraler Bedeutung für das Verständnis der Wirkung von HGF in der kutanen Wundheilung ist.

8.3 Abstract

HGF (*hepatocyte growth factor*) is a pleiotrophic cytokine that activates its receptor MET in a mesenchymal-epithelial interaction, leading to a variety of cellular responses such as proliferation, migration, morphogenesis, angiogenesis and anti-apoptosis. By these effects the HGF/MET signal transduction system aligns cellular activities during cutaneous wound healing, whereas the molecular mechanisms in comparison to other cytokines are not completely understood. Therefore the impact of HGF versus KGF and GM-CSF on the gene regulation of primary keratinocytes during cutaneous wound healing has been analysed in a model based on a heterologous feeder-layer coculture. Thus the primary influences of these growth factors could be evaluated while their secondary and compensatory effects were omitted.

Common and specific target genes of HGF, KGF and GM-CSF have been identified by oligonucleotide array analysis. The regulation of these genes could be exemplarily confirmed for FRA1, CTGF, TNFAIP3, K10 and uPAR by qPCR, and for the latter also by Western Immunoblot. Further, HGF-specific, functional consequences of the uPAR upregulation were proven *in vitro* by a scratch test with a neutralising uPAR-antibody. In fact, the coexpression of MET and uPAR in activated keratinocytes particularly within the migration tongue as well as the bioavailability of HGF could be detected *in vivo* during wound healing, indicating both that HGF has a major and specific impact on the formation of the migration tongue and that uPAR is involved in this process.

Therefore a wound healing model close to the *in vivo* situation could be established and verified within this thesis, which enables the analysis of specific influences of HGF and other significant cytokines in wound healing on the expression of target genes in primary keratinocytes. The expression of the identified target genes bears a pivotal relevancy for the understanding of the HGF function within cutaneous wound healing.

8.4 Danksagung

Lieber Herr Prof. Dr. Schirmacher, ich möchte mich bei Ihnen sehr bedanken, daß Sie mir ermöglicht haben, die Promotionsarbeit bei Ihnen und mit der fachlichen Unterstützung von Kai durchzuführen. Weiterhin möchte ich Ihnen, Prof. Dr. Angel und Axel danken, daß Sie mir die äußerst fruchtbare Kooperation im DKFZ ermöglicht haben!

Lieber Kai, vielen lieben Dank besonders für Deinen großen Einsatz beim sehr hilfreichen Korrekturlesen!

Lieber Axel, lieber Frank und liebe Frau Prof. Dr. Dr. Mauch, Euch bzw. Ihnen möchte ich vor allem für die fachliche Beratungen und Gespräche ganz herzlich danken! Außerdem möchte ich mich bei Frank, Prof. Dr. Dohmen und Prof. Dr. Schomburg bedanken, daß Du/Sie sich bereit erklärt hast/haben, mich zu prüfen!

Liebe Laborfeen, insbesondere liebe Eva und liebe Tanja, vielen lieben Dank für das schöne, freundliche und ehrliche Arbeitsklima, sowie die unglaublich tolle Unterstützung besonders zum Ende hin!

Mein geliebter Ehemann Jens, bei Dir möchte ich mich in tiefer und inniger Liebe bedanken, daß Du immer für mich da bist und mich aufbaust, wenn ich Dich brauche, für den Rückhalt, den Du mir gibst und die kulinarische Motivation!!!

Liebe Mama und lieber Papa, vielen Dank, daß Ihr mein Interesse für die Natur geweckt, mein Studium ermöglicht und mich als Kind nicht auf den Kopf fallen gelassen habt!

Liebe Ingeburg, vielen lieben Dank für Deine wegweisende Unterstützung!

Lieber Herr Liptow, Herr Prof. Dr. Burda, Herr Prof. Dr. Hensel und Frau Dr. Klauer, vielen Dank, daß Sie die Biologie mit so viel ansteckender Freude und Begeisterung gelehrt haben!

Einen ganz herzlichen Dank auch an alle anderen lieben Menschen, die mir bei der Durchführung der Arbeit direkt oder indirekt geholfen haben, allen vorweg Katharina und Silke, meine Geschwister Sue, Christian und Michi, sowie meine Schwiegereltern und Liane!

8.5 Erklärung gemäß der Promotionsordnung (§ 3 Abs. 1 Nr. 10)

Ich versichere, daß ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit - einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen -, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; daß diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegt hat; daß sie - abgesehen von den unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, daß ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluß des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von PD Dr. Sprenger und Prof. Dr. Schirmacher betreut worden.

-keine Teilpublikationen-

8.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Stephanie Schnickmann
geboren am 27.06.1974
in Köln
verheiratet
deutsche Nationalität

Kontaktdaten

Am Leerberg 35
69239 Neckarsteinach
06229 933600
Stephanie.Schnickmann@web.de

Promotionsarbeit

07.2001 – 08.2004	Universität zu Köln, Institut für Pathologie, Prof.. Dr.. Schirmacher/PD Dr. Sprenger
08.2004 – 07.2005	Universität Heidelberg, Pathologisches Institut, Prof. Dr. Schirmacher/PD Dr. Sprenger

Hochschulausbildung

WS 95/96 – WS 00/01	Lehramtstudiengang für SI und SII in den Fächern Biologie und Pädagogik an der UGH Essen
WS 96/97 - SS 99	Diplomstudiengang Erziehungswissenschaft an der UGH Essen

Hochschulabschlüsse

06/1999	Diplom Erziehungswissenschaften an der UGH Essen
11/2000	Erstes Staatsexamen für die Lehrämter SI und SII in den Fächern Biologie und Pädagogik an der UGH Essen

Schulausbildung

1981 - 1985	Grundschule Neunkirchen
1985 - 1991	Gymnasium Antonius Kolleg Neunkirchen
1991 -1992	Highschool Shawnee Mission North, Kansas City (USA, Schüleraustausch)
1992 -1994	Gymnasium Antonius Kolleg Neunkirchen

Schulabschlüsse

1992	Highschool Diplom an der Highschool Shawnee Mission North
1994	Abitur am Gymnasium Antonius Kolleg Neunkirchen

Praktische Tätigkeiten

04/1999 – 03/2000	Studentische Hilfskraft im Grundkurs Genetik (Genetisches Institut/UGH Essen)
08/1994 – 06/1995	Freiwilliges Soziales Jahr bei der DRK Schwesternschaft „Bonn“ e.V. (Klinik für Neurologie und Augenheilkunde/Universität Bonn)
1992 -1994	Kinder- und Jugendbetreuung im evangelischen Pfarramt Neunkirchen